Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. D. Henschler

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG DER FOLSÄURE BEI METHANOLVERGIFTETEN RATTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Mohammad Naghdi
aus Rafsenjan / Iran

Würzburg 1970

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. D. Henschler

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG DER FOLSÄURE BEI METHANOLVERGIFTETEN RATTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Mohammad Naghdi
aus Rafsenjan / Iran

Würzburg 1970

Referent: Priv. Doz. Dr. N. Rietbrock

Korreferent: Professor Dr. D. Henschler

Tag der Promotion:

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Problemstellung	15
C. Methodik	16
a) Allgemeine Versuchsanordnung	16
b) Isoliert perfundierte Rattenleber	18
c) Isolierung der Dihydrofolatreduktase	20
d) Analytische Methoden	20
1) Bestimmung der Dihydrofolatreduktase-Aktivität	20
2) Isolierung und Bestimmung von Methanol im Harn	24
3) Isolierung und Bestimmung von Ameisensäure im Harn	26
4) Bestimmung von Laktat	27
5) Bestimmung von Pyruvat	28
6) Hämoglobinbestimmung	28
D. Ergebnisse	29
a) Beeinflussung der Folatreduktaseaktivität der Rattenleber durch Amethopterin und Folsäure	29
1) Amethopterin	29
2) Folsäure	29
b) Einfluß von Folsäure auf die Elimination von Methanol und Ameisensäure im Harn	32
c) Einfluß des Folsäureantagonisten Amethopterin auf die Elimination von Methanol und Ameisensäure im Harn	36
d) Beeinflussung der Formiatoxydation in der isoliert perfundierten Rattenleber durch Tetrahydrofolsäure	40
E. Diskussion	41
F. Zusammenfassung	43
G. Literaturverzeichnis	I-XI

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543519_0075

A. EINLEITUNG

Seit vielen Jahrzehnten ist bekannt, daß Methylalkohol im Gegensatz zu Äthylalkohol, der seit Menschengedenken als Rausch- und Genußmittel dient, toxisch wirkt und krankhafte, zum Teil irreversible Symptome hervorruft, die nicht selten zum Tod führen. Es gibt eine Reihe von Autoren, die über Massen- und Einzelvergiftungen sowie über chronische Methanolintoxikationen Angaben gemacht haben. So berichtet z.B. STRÖHMBERG (1905) über 15 Todesfälle einer Gruppe von 18 Personen in DORPAT. Im gleichen Jahr fiel an den Kliniken von New Orleans (USA) eine ungewöhnlich hohe Zahl von partiellen bzw. totalen Erblindungen auf, die durch ein innerlich angewandtes methanolhaltiges Antiseptikum hervorgerufen worden waren (OPHTH. RECORD 1904, kein Autor).

STRATEMANN (1969) hat einige Tabellen ausgearbeitet, die genaue Auskunft über die Anzahl der Erkrankten, den Ort der Erkrankung, über reversible und irreversible Symptome, Todesfälle, sowie über letale Dosen von Methanol bei verschiedenen Tierspezies und beim Menschen geben. Im allgemeinen findet sich bei den Tierspezies nach Vergiftung mit Methylalkohol folgendes Verhalten: Ataxie, Schlafsucht, bei höheren Dosen manchmal Erbrechen, fast immer Appetitlosigkeit bei gleichzeitig starkem Durst. In Bezug auf diese Symptome kann bei manchen Tieren, z.B. bei Hunden, nach Beobachtungen von BÜRGER (1912) und LEO (1925) nach mehrmaliger Intoxikation eine gewisse Gewöhnung beobachtet werden.
Beim Menschen dagegen ist das Krankheitsbild einheitlich und charakteristisch. Die ersten Symptome, die nach einer Latenzzeit von einigen Stunden bis zu 2 oder 3 Tagen (STINEBAUGH 1960) auftreten, sind Mattigkeit, Anorexie, Kopfschmerzen und Nausea. Hinzu treten Magen-Darmbeschwerden, evtl. Erbrechen, dann doppelseitige Sehstörungen, welche zumeist als Flimmern und neblig verschwommenes Sehen beginnen und sich

innerhalb kurzer Zeit bis zur völligen Erblindung verschlechtern können. Bei vielen der Vergifteten kommt es nach einigen Tagen bis Wochen zu einer scheinbaren Besserung, die sich bald wieder erheblich verschlechtert. Bei schweren Vergiftungsfällen treten heftige Schmerzen im Epigastrium, im Rücken und in den Extremitäten auf. Auch krampfartige Zustände und niedriger Blutdruck sind beobachtet worden. KINI und COOPER (1962) vertreten die Ansicht, daß die Prognose bei Vorhandensein von Dyspnoe und Cyanose bei einem mit Methanol vergifteten Patienten infaust sei. Der Tod erfolgt in inspiratorischer Apnoe wegen Ausfall des Atemzentrums. Infolge der Azidose mit starkem Abfall der Alkalireserve treten Chemorezeptoren, die normalerweise dem Atemzentrum neue Impulse bringen, in Schwierigkeiten, was natürlich sehr rasch zur Schädigung des O_2-empfindlichen ZNS und zum Stillstand des Atemzentrums führt.

Das Auftreten der ernsten Symptome der Methanolvergiftung verläuft parallel zu einer deutlich ausgeprägten metabolischen Azidose (ROE 1943, 1946; CHEW u. Mitarb. 1946; BENTON u. CALHOUN 1952; KANE u. Mitarb. 1968). Dabei kann die Blutalkalireserve auf 20 bis 15 vol-% fallen und, wie USTVEDT u. MOHN (1932) angeben, soll in einem Falle als Ausdruck der Azidose ein Blut-pH von 7, 08 gemessen worden sein (normal 7, 35). ROE (1946) und LUND (1948 a) konnten nachweisen, was auch ERLANSON u. Mitarb. (1965) später bestätigten, daß das Ausmaß der metabolischen Azidose letztlich durch die Akkumulation von Ameisensäure im Blut verursacht wird, die etwa 40 - 50 Stunden nach Zufuhr des Giftes ihr Maximum erreicht (LUND 1948 a). Außerdem konnte LUND (1948 b. u. c) zeigen, daß es zu einem Anstieg der Formiatexkretion im Harn mit einem Maximum am 3. und 4. Tag kommt. KLAUER (1938) gab hierzu an, daß bei einer Formiatkonzentration von 100 mg/1, 5 l Harn an eine Methanolvergiftung zu denken sei.

Ursachen der Methanol-Toxizität:

Über längere Zeit wußte man nicht, weshalb orale Methanolaufnahme zu diesen Symptomen führt. Im Gegensatz zu SOLLMANN (1921) glaubten verschiedene Autoren (KUHNT 1899, FÜHNER 1905, NICLOUX u. PLACET 1912, ROSTEDT 1921, THEILLER 1923, ATKINSON 1925), daß andere toxisch wirkende Substanzen, wie z.B. Aceton, Allylalkohol oder Allylacetat, die mit Methanol gemischt worden waren, diese Veränderungen hervorrufen. Erst 1923 gelang es REIF, im Zusammenhang mit einer Hamburger Massenvergiftung nachzuweisen, daß der Methylalkohol für die Intoxikationen verantwortlich war. Eine gewisse Bestätigung für die REIFsche Ansicht erbrachten die Befunde von ADLER u. Mitarb. (1938). Sie provozierten durch Gabe von Methanol an Kaninchen die für Methanolvergiftung charakteristischen Augenveränderungen.
EGG (1927) vertrat die Ansicht, daß der unveränderte Methylalkohol durch Komplexbildung mit intrazellulären Fe-Ionen zur Hemmung der Oxydationsvorgänge im Organismus und damit zu den Vergiftungserscheinungen führe. MAYER (zit. bei GETTLER u. GEORG 1918) stellte zum ersten Male fest, daß Ameisensäure und Formaldehyd 6 bzw. 33 mal toxischer sind als Methanol selbst. Da Formaldehyd und Ameisensäure durch Oxydation von Methanol im Organismus entstehen, war es naheliegend anzunehmen, daß diese Oxydationsprodukte des Methanols für dessen Toxizität verantwortlich seien. Jedoch wußte man nicht, welche von beiden, Ameisensäure oder Formaldehyd,das eigentliche toxische Agens bei Methanolintoxikationen ist. Viele Untersucher gaben dem Formaldehyd als echtes Zellgift den Vorrang (BRÜCKNER 1924, FLURY u. WIRTH 1936).

POTTS u. JOHNSOHN (1952) vertraten die Ansicht, daß Formaldehyd sowohl Oxydationsprozesse als auch die anaerobe Glykolyse im hohen Maße beeinträchtigt. In vitro reichen schon Konzentrationen von $0,5 \times 10^{-3}$ M Formaldehyd zur Hemmung dieser Vorgänge aus (KINI u. COOPER 1962). KEESER (1931 a) konnte bei Kaninchen, die mit Methanol vergiftet worden waren, Formaldehyd in Liquor, Glaskörper und Bauchhöhlenflüssigkeit

finden und bestätigte damit die genannten Ansichten. Es gelang ihm außerdem zu zeigen, daß Methanol durch verflüssigte Glaskörpersubstanz frisch geschlachteter Kälber in Formaldehyd umgesetzt wird (KEESER 1931 b). Auch mit Leberbrei war die Durchführung dieser Reaktion möglich (KEESER u. VINCKE 1940, HELLWIG 1940, KEESER u. ALBERTY 1948). Diese Autoren sind zu der Ansicht gekommen, daß Formaldehyd die Erscheinungen der Methanolvergiftung durch eine Veränderung der Eiweißstrukturen des Organismus herbeiführe.

Wir wissen heute, daß die Befunde des Arbeitskreises um KEESER nicht annehmbar sind, da die verwendeten Nachweisverfahren sehr unspezifisch waren. Diese Befunde konnten mit genaueren Untersuchungsverfahren nicht bestätigt werden (SCOTT u. Mitarb. 1933, AGNER u. BELFRAGE 1947). Trotzdem wird der Formaldehyd bis in die jüngste Zeit als die spezifisch toxische Substanz bei der Methanolvergiftung angesehen, weil er in vitro den Stoffwechsel der Retina, eine Praedilektionsstelle der Vergiftung, empfindlich stört (LEAF u. ZATMAN, 1952). Daß der Nachweis des Formaldehyds in vivo sehr schwierig ist und nur in wenigen Fällen gelang, liegt nach Meinung der Autoren an seiner Bindung an Eiweiß, wodurch er mit den zum Nachweis verwendeten Farbreaktionen nicht erfaßt werde.

KEESER 1931 a; POHL 1893; BONGERS 1895; SCHMIEDEBERG 1912; v. HARNACK 1912 und LEO 1925 wiesen darauf hin, daß die Ameisensäure als zweiter Metabolit des Methanols eine große Rolle bei der Vergiftung spielt. In diesen Untersuchungen und denen späterer Autoren (HAGGARD u. GREENBERG 1939, BASTRUP 1947, BARTLETT 1950) konnten oft signifikante Änderungen des Formiatspiegels im Blut und der Ameisensäureexkretion im Harn nach Methanolgabe nachgewiesen werden. POHL (1893) hat schon darauf aufmerksam gemacht, daß die Symptome der Vergiftung mit Formaldehyd auf keinen Fall denen der Methanolvergiftung gleichen. Zudem stellte er fest, daß die Formiatkonzentration im Harn gleichzeitig mit den klinischen Symptomen einen Höhepunkt hat.

Schicksal von Methanol im Organismus:

1. Resorption und Verteilung:

Nach oraler Methanolaufnahme kommt es zu einer Resorption von Methanol aus dem Verdauungstrakt, welche nach HAGGARD u. GREENBERG (1939) auch bei hohen Dosen binnen ca. 6 Std. abgeschlossen ist. BONGERS (1895) behauptet jedoch, daß eine Resekretion in den Magen stattfindet, so daß noch zwei Tage nach Aufnahme geringe Mengen Methanol im Magen-Darm-Trakt nachweisbar sein können (KAPLAN 1962). Die Verteilung im Organismus entspricht nach HAGGARD u. GREENBERG (1939) sowie YANT u. SCHRENK (1937) dem Wassergehalt der Gewebe und ist am niedrigsten im Knochenmark und Fettgewebe. Die höchsten Methanolkonzentrationen finden sich im Gehirn (OGATA u. Mitarb. 1963, 1964), im Magen-Darm-Trakt, im Liquor (BENNETT u. Mitarb. 1953) und im Blut, während sie in der Leber, Niere und Muskulatur, sowie in Lungen und Herz geringer sind (KUNIYOSHI 1957). AGNER u. BELFRAGE (1947) haben bewiesen, daß im Blut des Kaninchens nach etwa 4 Stunden bei Zufuhr von 2, 2 g/kg Methanol das Konzentrationsmaximum erreicht ist.

2. Elimination:

Die Ausscheidung des Methanols erfolgt einmal als unverändertes Methanol im Harn und in der Expirationsluft, zum anderen durch Oxydation zu Ameisensäure und weiter zu CO_2, welches wiederum vorwiegend über die Niere als Bikarbonat und über die Lunge als CO_2 eliminiert wird. Über die Eliminationsgeschwindigkeit gehen die Meinungen auseinander. WIDMARK (1933) behauptet, daß ein Mensch von 70 kg Körpergewicht imstande ist, in 24 Stunden etwa 34 g Methanol auszuscheiden .NEYMARK (1936) dagegen gab ein Eliminationsmaximum für den Menschen von etwa 14, 4 g/tägl. an. Gegen diese beiden Ansichten wird Einspruch erhoben, seit die Markierung der Substanzen möglich ist. BARTLETT (1950) gab Ratten markiertes Methanol (^{14}C) und stellte dabei fest, daß der Hauptweg der Methanolelimination Oxydation sei und nicht Abatmung von unverändertem Methanol durch die Lunge.

AEBI u. Mitarb. (1957) bestätigten diese Ansicht, indem sie Ratten mit 35-45 mg/kg ^{14}C-Methanol belasteten und sahen, daß während der darauffolgenden 48 Stunden etwa 50 - 60 % des gegebenen Methanols als CO_2 (^{14}C), also als Oxydationsprodukt des Methanols, in der Atemluft zu finden sind, demgegenüber aber ungefähr 10 - 15 % in unveränderter Form ausgeatmet werden und 14 % im Harn nachzuweisen sind. Daraus ergibt sich, daß das Methanol erst oxydiert und dann die Oxydationsprodukte auf verschiedenen Wegen, wie durch Lunge, Niere und Schweißdrüsen, eliminiert werden.

Die Ansichten über die Eliminationscharakteristika für Methanol zeigen erhebliche Variationen. NICLOUX u. PLACET (1912), BILDSTEN (1924), WIDMARK u. BILDSTEN (1924), NEYMARK (1936), KOIVUSALO (1956) geben für Kaninchen eine lineare Elimination an, während HAGGARD u. GREENBERG (1939), AGNER u. BELFRAGE (1947), sowie LEAF u. ZAITMAN (1952) behaupten, daß die Methanolelimination über die Niere bei Ratte, Hund, Kaninchen und Mensch in exponentieller Form stattfindet und von der Blutkonzentration abhängig ist.

Das Verhältnis von Urin- zu Blutkonzentration ist während des gesamten Eliminationsvorganges relativ konstant und beträgt 1, 27 - 1, 3.

RIETBROCK (1969) zeigt in neuesten Untersuchungen eine S-förmige Eliminationskurve für Methanol und ist der Ansicht, daß während des Ablaufs der Elimination durch Methanol eine Enzyminduktion des methanolumsetzenden Enzymsystems einsetzt, wonach die Methanolelimination in den ersten 16 Std. eine starke Beschleunigung erfährt.

Bei der Methanoloxydation entsteht zunächst Formaldehyd. Für diesen Schritt wird die Beteiligung von 3 Enzymsystemen diskutiert:

1. Alkoholdehydrogenase (ADH), die von LUTWAK-MANN (1938) erörtert wird.
2. Katalase: Neben ADH ist noch Katalase zum oxydativen Methanolabbau befähigt. Für eine wesentliche Rolle dieses Enzyms spricht die Hemmbarkeit der Methanoloxydation bei der Ratte durch 3-Amino 1, 2, 4 Triazol (TEPHLY u. Mitarb. 1961, 1964).

KRAUTZ u. HARTREE (1939, 1945) haben schon früh auf die Bedeutung der Katalase bei der Methanoloxydation in vitro hingewiesen und CHANCE (1947, 1948) und JACOBSEN (1952 a. u. b) bestätigten und ergänzten diese Befunde. Die mit gereinigtem Enzym ausgeführten Untersuchungen hatten ergeben, daß Katalase auf Grund ihrer peroxydatischen Wirkung eine Reihe von Substanzen wie z.B. Methanol, Äthanol und andere höhere Alkohole, Nitrit und Ferrocyanid in vitro zu oxydieren vermag. Dabei vereinigt sich H_2O_2 zunächst mit der Katalase unter Bildung eines reaktionsfähigen H_2O_2-Komplexes, der Methanol anschließend zu Formaldehyd oxydiert. Die Oxydation konnte durch Peroxyd liefernde Stoffe wie Glukose, Thiolverbindungen, Askorbat und Purinderivate verstärkt werden (MANNERING u. PARKS 1957, AEBI u. Mitarb. 1957).

3. Mikrosomale Enzyme: RIETBROCK u. Mitarb. (1968) haben die Oxydation von Methanol durch mikrosomale Enzyme aus Lebern von Ratte und Hund nachgewiesen.

Hinweise für die Existenz eines weiteren Mechanismus der Methanoloxydation lieferten erstmals Befunde von HASSAN u. Mitarb. (1966, 1967), nach denen die Oxydation des Methanols durch Acetylsalicylsäure und Acetanilid hemmbar ist. Der Mechanismus der Oxydationshemmung wird von den genannten Autoren auf eine Verminderung des für die Katalasereaktion notwendigen Peroxyd-Pools durch Acetylsalicylsäure und Acetanilid zurückgeführt. Beide Substanzen werden aber bekanntlich durch Lebermikrosomen zu p-, o- und m-Acetaminophenol (MITOMA u. UDENFRIEND 1955) bzw. zu Salicylsäure und Essigsäure hydrolysiert (HOWES u. HUNTER 1968). Die Annahme ist berechtigt, daß Methanol am Ort der Oxydation in den Mikrosomen mit Acetylsalicylsäure und Acetanilid interferiert bzw. ebenfalls von dem mikrosomalen Enzymsystem umgesetzt werden könnte. RIETBROCK u. Mitarb. (1968) haben daraufhin diese Möglichkeit überprüft und den Methanolumsatz durch mikrosomale Enzyme untersucht. Sie haben zunächst bewiesen, daß in der Mikrosomenfraktion eine Methanoloxydation tatsächlich ablaufen kann. Ferner konnte gezeigt werden, daß die nächsten Oxydationsstufen,

nämlich Formaldehyd und Ameisensäure, rasch im Stoffwechsel oxydiert werden (MALORNY u. Mitarb. 1965).

Oxydation des Formaldehyds:

Der zweite Schritt des Methanolumsatzes wäre jetzt der weitere Abbau des Formaldehyd. Für den Formaldehyd gibt es eine Vielzahl von Oxydationsmöglichkeiten. In vitro sind folgende Enzyme imstande, Formaldehyd zu Ameisensäure zu oxydieren: Aldehydoxydase (GORDON u. Mitarb. 1940, CARPENTER 1951) Xanthinoxydase (SCHARDINGER 1902, MORGAN u. Mitarb. 1922, MORGAN 1926), Katalase (CHANCE 1948) und eine spezifische NAD-abhängige Formaldehyddehydrogenase der Leber(STRITTMATTER u. BALL, 1955).

In vivo findet die Oxydation des Formaldehyds nach seiner Bildung aus Methanol in der Leber sowohl in der Leber als auch im Blut statt. Hier wird er sehr rasch von den Erythrozyten aus dem Plasma abgefangen und in diesen durch eine lösliche Formaldehyddehydrogenase oxydiert (MALORNY u. Mitarb. 1965). Diese letztere Forschungsgruppe behauptet ebenfalls, daß die peroxydatische Wirkung der Katalase in den Erythrozyten an der Oxydation des Formaldehyds eine Rolle spielt. Bei der Vielzahl der Oxydationsmöglichkeiten für den Formaldehyd ist es möglich, daß er im Organismus schnell umgesetzt wird. RIETBROCK (1965) stellte dementsprechend fest, daß die biologische Halbwertzeit des Formaldehyds bei verschiedenen Tierspezies übereinstimmend höchstens eine Minute beträgt. Mit dieser kurzen Verweildauer des Formaldehyds im Organismus ist die Wahrscheinlichkeit, daß Formaldehyd das toxische Agens ist, nicht groß. Durch Oxydation des Formaldehyds entsteht Ameisensäure, deren Umsatz langsamer erfolgt als die des Formaldehyds. Zu einem geringeren Teil wird sie unverändert über die Niere ausgeschieden. Der Hauptweg der Elimination ist aber auch hier wie beim Formaldehyd die Oxydation, welche aber bei den verschiedenen Tierspezies mit unterschiedlicher Geschwindigkeit vor sich geht.

Die Ratte zeigt mit 12 Min. eine sehr niedrige Halbwertzeit für Formiat; der Hund zeigt eine Halbwertzeit von 77 Min. Zwischen diesen beiden Extremwerten liegen die Werte für Meerschweinchen, Kaninchen und Katze (RIETBROCK 1965).

Möglichkeiten der Formiatoxydation:

Die meisten Organismen verfügen über Enzyme, die auch Ameisensäure zu CO_2 oxydieren. In Pflanzen z.B. existiert eine spezifische Formiat oxydierende Dehydrogenase (MATHEWS u. VENNESLAND 1950), im Tierreich die Katalase, die mit Hilfe von Peroxyd Formiat sowohl in vivo als auch in vitro umsetzt (KEILIN u. HARTREE 1945).
Es ist jedoch nicht bei allen Tierarten eine Parallelität zwischen Katalaseaktivität und Formiatumsatz vorhanden. Während bei der Ratte eine Übereinstimmung besteht, setzt Pferdeleber trotz höherer Katalaseaktivität Formiat nur langsam um. Bei Kaninchen aber ist trotz geringer Katalaseaktivität die Oxydationsrate für Formiat hoch (AEBI u. Mitarb. 1957). Diese widersprechenden Ergebnisse stellen eine wesentliche Beteiligung der Katalase am Formiatumsatz in Frage.
Man konnte mit Hilfe von Isotopenversuchen aber bald feststellen, daß Formaldehyd und Ameisensäure nicht nur oxydiert werden, sondern auch an Reaktionen teilnehmen, in denen die Einkohlenstoffeinheit unverändert aktiviert und übertragen wird.
Isotopenversuche ergaben, daß Formaldehyd und Ameisensäure Vorstufen der Methylgruppe des Cholins (DU VIGNEAUD u. VERLY 1950; DU VIGNEAUD u. Mitarb. 1951; ARNSTEIN 1950, JONSSON u. MOSHER 1950), des Methionins (SAKAMI u. WELCH 1950, SIEKEVITZ u. GREENBERG 1950), des Ureidkohlenstoffes 2 und 8 der Harnsäure (MARSH 1951, GREENBERG 1951, 1953), des β-Kohlenstoffatoms von Serin (SIEGEL u. LAFAYE 1950) sowie des Amidin-Kohlenstoffs von Histidin (MITOMA u. SNELL 1955) darstellen.

Weiter gelang es nachzuweisen, daß die Folatcoenzyme als Katalysatoren beim Transfer der C_1-Einheiten sowie bei ihrer Umwandlung ineinander eine bedeutende Rolle spielen. BENNET (1949) erkannte, daß die Folsäure bei der Bildung von Methionin mitbeteiligt ist. SAKAMI u. WELCH (1950) stellten fest, daß in Leberschnitten von Folsäuremangelratten durch Folsäuregabe die Methylbildung aus Formiat erhöht wird. VERLY u. Mitarb. (1952) haben bei Verwendung von Methanol als Methyldonator gleiche Ergebnisse erzielt. PLAUT u. Mitarb. (1950) gaben an, daß bei mit Folsäure behandelten Ratten nach Zufuhr von ^{14}C-Formiat 10 mal mehr ^{14}C-Kohlenstoff im Leberprotein und 3 mal mehr im Eingeweideprotein vorhanden ist als bei Folsäuremangelratten. Dabei findet sich der Formiat-Kohlenstoff im Serin wieder, worauf auch SAKAMI (1948) schon hingewiesen hatte. Außerdem wird Formiat von Ratten mit Folsäuremangel in weit geringerem Umfang zur Purinsynthese verwendet als von solchen, die zusätzlich Folsäure erhalten haben (DRYSDALE u. Mitarb. 1951).

Die Folsäure und ihre im Organismus vorkommenden Derivate bedürfen, um als Akzeptor und Überträger von C_1-Fragmenten auf den Oxydationsstufen von Methanol, Formaldehyd und Formiat sowie bei der Überführung dieser Stufen ineinander wirksam werden zu können, der Reduktion am eigenen Pyrazinring. Dabei entsteht möglicherweise über 7, 8-Dihydrofolsäure (PERAULT u. PULLMANN 1960) als biologisch wirksame Form 5, 6, 7, 8-Tetrahydrofolsäure.

Reduktion von Dihydrofolsäure zu Tetrahydrofolsäure in vivo:

In vivo erfolgt die Umwandlung unter Mitwirkung von NADPH und Dihydrofolatreduktase, die aus der Leber verschiedener Tiere oder aus Bakterienextrakten von z. B. Strept. faecalis isoliert werden kann.

$$\text{Dihydrofolate} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longleftrightarrow \text{Tetrahydrofolate} + \text{NADP}^+ .$$

Dihydrofolatreduktase läßt sich durch Folatantagonisten z. B. 4-Aminofolatanaloge wie 4-Aminopteroylglutaminsäure (Aminopterin ^{R}) und

4-Amino-10-methyl Pteroylglutaminsäure (Amethopterin oder Methotrexat^{R}), deren Affinität zur Dihydrofolatreduktase etwa 10^5 mal größer ist als die des normalen Substrates, hemmen (OSBORN u. Mitarb. 1958; NATH u. GREENBERG 1962).

BLAKLEY u. Mc DOUGALL (1961) haben diesen Inhibitionsmechanismus im Bakterientrakt zuerst veröffentlicht. Eine Reihe von anderen Autoren (FUTTERMANN 1957, OSBORN u. Mitarb. 1958, PETERS u. GREENBERG 1959, MISRA u. Mitarb. 1961, BERTINO u. Mitarb. 1960, NATH u. GREENBERG 1962, ZAKRZEWSKI 1966 und WERKHEISER 1961) haben dies experimentell im tierischen Gewebe geprüft und bestätigt, wurden sich aber in der Kinetik der Inhibition nicht einig. BLAKLEY u. Mc DOUGALL (1961) sowie NATH u. GREENBERG (1962) gelang es zu zeigen, daß gereinigte Enzyme aus Hühnerlebern, Strept. faecalis und Thymus durch Amethopterin nicht kompetitiv gehemmt werden. Diese Versuche wurden bei einem pH von 7, 5 mit Dihydrofolat als Substrat durchgeführt. Demgegenüber benützte WERKHEISER (1961) Folsäure als Substrat bei einem pH von 6, 1 und stellte fest, daß die Hemmung der Enzymaktivität in der Rattenleber pseudoirreversibel aber stöchiometrisch sei. Da bei diesen Studien die Wirkung von pH und Kationen nicht berücksichtigt worden war, sind BERTINO u. Mitarb. (1964), um genauere Auskünfte zu erhalten, mit teilweise gereinigtem Enzym von Ehrlich-Asciteszellen der Kinetik dieser Reaktion nachgegangen.
Das Inhibitionsmaximum sowohl für Folat als auch für Dihydrofolat liegt bei pH 5, 9, maximale Reduktionsaktivität der Folatreduktase bei Folat als Substrat liegt bei pH 5, geringste Aktivität bei pH 7 und höher. Bei Dihydrofolat als Substrat liegt das pH-Optimum bei 5, 9 und 7, 6.

Durch Bindung an Tetrahydrofolsäure werden die C_1-Fragmente biologisch reaktionsfähig. Durch komplizierte Reaktionsvorgänge entsteht z.B. mit Hilfe von ATP $N_{(10)}$-Formyltetrahydrofolsäure die "aktivierte Ameisensäure". Diese Reaktion wird katalysiert durch die Tetrahydrofolat-Formylase, ein in Pflanzen- und Tierreich sowie in Bakterien weit ver-

breitetes Enzym. Es findet sich als cytoplasmatisches Protein auch in Mitochondrien und Mikrosomen (BRODE u. JAENICKE 1961), am reichlichsten in der Warmblüterleber, besonders bei Taube und Schaf (GREENBERG 1954, BRODE u. JAENICKE 1961).

Nach Einschleusung der aktivierten Ameisensäure in den C_1-Stoffwechsel findet diese zu einem geringen Teil bei der Synthese körpereigener Verbindungen wie z.B. Purinen und Aminosäuren Verwendung. Der überwiegende Teil wird jedoch auf bisher ungeklärtem Weg zu CO_2 oxydiert. NAKADA u. WEINHOUSE (1953), ORO u. RAPPOPORT (1959), AEBI u. Mitarb. (1963), sowie RAPPOPORT u. MÜLLER (1967) behaupten, daß das Katalase-Peroxydase-System bei diesem Oxydationsvorgang eine Rolle spielt. Über deren Wirkungsgrad aber kann noch keine genaue Aussage gemacht werden.

Andererseits sprechen mehrere Befunde für die Annahme, daß Formiat vorwiegend oder ausschließlich über den Folatzyklus zu CO_2 oxydiert wird. So wiesen PLAUT u. Mitarb. (1950) nach, daß bei Folsäuremangel in vivo und vitro die Oxydation des Formiats zu CO_2 herabgesetzt ist. Gleichzeitig steigt aber die Formiat-Ausscheidung im Harn stark an (RABINOWITZ u. TABOR, 1958). SAKAMI (1948) verabreichte Ratten ^{14}C-Formiat und konnte den überwiegenden Anteil der organisch eingebauten Aktivität im Serum wieder nachweisen. Aus den Ergebnissen von SAKAMI (1948) und NEELY (1964) lassen sich folgende Schlüsse ziehen: Der Organismus besitzt offenbar für im Überschuß angebotenes Formiat einen Entgiftungsmechanismus, in dem dieses nach Aktivierung zu $N_{(10)}$-Formyltetrahydrofolsäure zunächst über $N_{(5)}$ - $N_{(10)}$ Methyltetrahydrofolsäure zu N_5 - N_{10} - Methylentetrahydrofolsäure reduziert wird. Durch anschließende Übertragung der Hydroxymethylgruppe auf Glycin entsteht Serin, das schließlich über Pyruvat im Zitronensäurezyklus zu CO_2 oxydiert werden kann. Die Annahme, daß auf diesem Wege eine wirksame Entgiftung des Formiats möglich ist, wird unterstützt durch Ergebnisse von DINNING u. Mitarb. (1949) an Ratten, sowie von MACHLIN u. Mitarb. (1951) an Hühnern. Nach ihren Befunden wird durch zusätzliche

Folsäurezugabe die Toxizität des Glycin herabgesetzt.

Entgiftungsmechanismus der Ameisensäure bei Folsäuremangel :

Die Entgiftung des Formiats, wie oben beschrieben, kann durch verschiedene Umstände erschwert oder unmöglich gemacht werden. Wenn eine reibungslose Entgiftung stattfinden soll, muß freier Folat-Cofaktor in ausreichender Menge vorhanden sein. Folsäuremangelzustände mit ihren vielfältigen klinischen Erscheinungen sind in der Humanmedizin seit langem bekannt und weit verbreitet (HERBERT 1964). Sie treten auf als Folge unzureichender Zufuhr bzw. Resorption im Magen-Darm-Trakt, z.B. beim "Malabsorption-Syndrom" oder bei ungeschickter Verabreichung von Folsäure-Antagonisten und Antikonvulsiva, ferner bei Verwertungsstörungen bei Lebererkrankungen oder bei Verlangen des Körpers nach größeren Mengen, z.B. in der Schwangerschaft. Die minimalste orale Verabreichungsdosis von Pteroylglutaminsäure beträgt bei Erwachsenen etwa 50 µg/Tag (HERBERT 1962), während der Schwangerschaft aber steigt die erforderliche Menge ohne Zweifel auf mehr als 50 µg/Tag an (CHANARIN 1959, BALL u. GILES 1964, HIBBARD 1964).
Die genaue erforderliche Menge ist jedoch noch nicht bekannt. Es ist aber erwiesen, daß eine orale Gabe von etwa 500 µg/Tag ausreicht (LOEWENSTEIN u. Mitarb. 1955), während Mengen von 20 - 30 µg/Tag mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit unzureichend sind (CHANARIN 1965). Latente Folsäuremangelzustände finden sich besonders häufig bei geschwächten und heruntergekommenen Individuen wie Alkoholikern, als Folge unzureichender Folataufnahme mit der Nahrung oder bei erhöhtem Bedarf des Organismus, z.B. in der Gravidität. Dieser Umstand sowie die Tatsache, daß der Folatbestand der Gewebe von Mensch zu Mensch große Schwankungen aufweist (ROBINSON 1966), mag zu einem großen Teil für die unterschiedliche Empfindlichkeit einzelner Individuen gegenüber Methanol verantwortlich sein.
Außerdem ist bei der exogenen Zufuhr von Formiat oder beim Freiwerden großer Ameisensäuremengen nach Gabe hoher Methanoldosen ein Mangel

an freiem Folat-Cofaktor zu erwarten, weil Folat-Cofaktor durch die Ameisensäure gebunden und schließlich gesättigt wird. Die Wirksamkeit des Entgiftungsmechanismus kann dann nur erhalten bleiben, wenn durch Kompensationsprozesse freie Tetrahydrofolsäure wieder zurückgebildet (JAENICKE u. KUTZBACH 1963) oder durch exogene Zufuhr immer wieder zur Verfügung gestellt wird.

RIETBROCK u. Mitarb. (1966) haben in Verfolgung dieser Gedanken versucht, durch Verabreichung von Folsäure den Methanolumsatz beim Hund zu beschleunigen und damit das Auftreten von Vergiftungserscheinungen zu verhindern. Hunde wurden mit Methanol vergiftet und anschließend Folsäure in einer Gesamtmenge von 30 mg/kg, auf drei Tage verteilt, intravenös verabreicht. Dadurch gelang es, den Ameisensäurespiegel bis fast zur Norm herunterzudrücken, während bei alleiniger Methanolgabe (2 g/kg) der Ameisensäurespiegel innerhalb weniger Stunden auf 14,3 mg% anstieg. Im Folsäuremangelzustand hingegen, erzeugt durch Amethopterin 1,5 mg/kg per os vor Methanolzufuhr, stiegen die Ameisensäurewerte im Plasma auf das Doppelte gegenüber den Kontrolltieren an.
Ob aber tatsächlich die Folate allein eine entscheidende Rolle bei der Methanolvergiftung spielen, ist noch nicht mit Sicherheit zu bejahen, da der gleiche Effekt auch mit Vit. B_{12} zu erzielen ist (MALORNY u. STIEREN 1967).

B. PROBLEMSTELLUNG

Die im Organismus durch Oxydation des Methanols freiwerdende Ameisensäure ist nach neueren Erkenntnissen für die spezifischen Erscheinungen der Methanolintoxikation verantwortlich. Durch Akkumulation der Ameisensäure im Blut verschiebt sich das pH des Blutes in den sauren Bereich, wodurch eine Azidose entsteht. Werden die Pufferkapazitäten der Gewebe gesättigt, passiert die freie Ameisensäure die Zellmembran und schädigt den Zellstoffwechsel (HERKEN u. RIETBROCK 1968). Durch Zufuhr von Folsäure an methanolvergiftete Hunde vor oder nach Vergiftungsbeginn stellten RIETBROCK u. Mitarb. (1966) fest, daß es möglich ist, die Akkumulation von Formiat im Plasma zu verhindern. Sie führten diese Versuche am Hund durch, weil Hund und Mensch hinsichtlich der Eliminationscharakteristika für Ameisensäure gewisse Ähnlichkeiten aufweisen (RIETBROCK 1968 a).

In Verfolgung dieser Gedankengänge haben wir als Versuchstiere Ratten gewählt und uns folgende Aufgaben gestellt:

1. Wie verhält sich eine methanolvergiftete Ratte im Hinblick auf Ameisensäureausscheidung bei Folsäuremedikation?
2. Wie groß ist die Ameisensäureausscheidung bei Ratten im Folsäuremangelzustand gegenüber unbehandelten Tieren?

Wie schon erwähnt, beruht die Wirksamkeit der Folsäure bei der Therapie methanolvergifteter Tiere auf ihrer Teilnahme als Akzeptor und Überträger von Einkohlenstoff-Fragmenten (JAENICKE u. KUTZBACH 1963). Nach vorliegenden Ergebnissen stellt dabei Tetrahydrofolat den entscheidenden Faktor für den Entgiftungsmechanismus dar, weil sie die metabolisch auftretende Ameisensäure auffängt, aktiviert und der weiteren Umsetzung zuführt. Andererseits wissen wir, daß biologisch aktives Tetrahydrofolat möglicherweise über Dihydrofolat entsteht (PERAULT u. PULLMANN 1960) und Dihydrofolatreduktase und NADPH dabei als Katalysatoren eine Rolle spielen (MATHEWS u. Mitarb. 1963).

Daraus resultiert die weitere Aufgabenstellung dieser Arbeit.

3. Ist es möglich, durch zusätzliche Folsäuregabe die Aktivität der Folatreduktase zu beeinflussen?
4. Ist durch Gabe von Folatantagonisten Amethopterin die Aktivität dieses Ferments völlig zu hemmen und ist diese Hemmung reversibel?
5. Es soll versucht werden, die Wirksamkeit der Tetrahydrofolsäure bei der Formiatoxydation mit Hilfe der isoliert-perfundierten Rattenleber zu überprüfen.

C. METHODIK

a) Allgemeine Versuchsanordnung:

Unsere Versuche wurden an insgesamt 300 jungen weiblichen Ratten des Stammes WISTAR AF/Han. durchgeführt. Das Körpergewicht der Tiere lag zwischen 30 und 50 g. Während des Versuches wurden sie in geräumigen Käfigen in Gruppen von 5 bzw. 6 Tieren in einem normal temperierten Raum gehalten.
Als Nahrung erhielten sie die Alleindiät für Ratten "Altromin B" der Firma Altrogge GmbH, Lage/Lip. und Leitungswasser ad libitum. Die Tiere waren nur ein einziges Mal im Versuch.

In einer ersten Versuchsreihe mit insgesamt 55 Ratten (11 Gruppen zu je 5 Tieren) wurden die Versuchstiere mit 5 mg/kg KG Methotrexat i.p. vorbehandelt. 14 Kontrollratten erhielten entsprechend 0, 9 %ige Kochsalzlösung. Nach 6, 12, 18, 24 usw. Stunden wurden die Tiere getötet, die Leber entnommen und die Hemmwirkung von Methotrexat auf die Dihydrofolatreduktase gemessen.
In einer zweiten Versuchsreihe mit insgesamt 60 Ratten haben wir Folsäure i.p. injiziert, und zwar eine Gruppe mit 1 x 10 mg/kg, eine zweite

mit 2 x 10 mg/kg und eine dritte mit 3 x 10 mg/kg in 24-stündigen Abständen. Dann wurden die Tiere getötet und die Wirkung der Folsäure auf die Enzymaktivität untersucht. Die 21 Kontrollratten bekamen wiederum 0, 9 %ige Kochsalzlösung.

Eine dritte Versuchsreihe mit insgesamt 50 Ratten, davon 20 Kontrolltiere, bekamen 5 mg/kg Methotrexat und eine Stunde später 4 g/kg 30 %iges Methanol. Die Tiere wurden in Stoffwechselkäfigen gehalten. Die alle 12 Stunden ausgeschiedene Harnmenge wurde gesammelt und auf Methanol und Ameisensäure untersucht.

Eine vierte Versuchsreihe von insgesamt 72 Tieren, davon 36 Kontrolltiere, wurden in drei Gruppen zu 24 Tieren unterteilt. Jede Gruppe bekam verschiedene Dosen Folsäure.

Gruppe a: 1 x 10 mg/kg Folsäure, eine Stunde später 2 g/kg 30 %iges Methanol und wiederum 2 x 10 mg/kg Folsäure an den nachfolgenden Tagen.

Gruppe b: 3 Tage lang täglich 10 mg/kg Folsäure und am 4. Tag 2 g/kg 30 %iges Methanol.

Gruppe c: 3 Tage täglich 10 mg/kg Folsäure, anschließend zwei Tage Pause und am 6. Tag 2 g/kg 30 %iges Methanol.

Gleich nach der Methanolgabe wurden die Tiere im Stoffwechselkäfig eingeschlossen und der 12-stündig ausgeschiedene Harn zur Bestimmung von Methanol und Ameisensäure gesammelt. Um eine Verunreinigung des Harns mit Nahrungsresten zu vermeiden, bekamen die Tiere alle 24 Stunden einmal über 1 - 2 Stunden ihre Nahrung. Anschließend reinigten wir die Käfige und entfernten Futterreste. Wasser hatten die Tiere in Saugflaschen immer zur Verfügung.

b) Isoliert-perfundierte Rattenleber :

Bei einer neuen Versuchsreihe versuchten wir, die Rolle der Tetrahydrofolsäure bei der Formiatoxydation mit Hilfe der isoliert-perfundierten Rattenleber festzustellen. Wir verwandten 300 bis 350 g schwere männliche Ratten. Die Tiere bekamen zur Narkose 0,6 ml/kg 20 % Urethan i.p.. Zur Verminderung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes wurde zuerst 0,8 ml/kg einer 40 %igen Heparinlösung i.v. gespritzt und später 1,5 ml in den Perfusionskreislauf hinzupipettiert.

Die Präparation[+)] wurde folgendermaßen durchgeführt: Zuerst wurde eine etwa 5 cm breite Hautschicht von der Symphyse bis zur Halsgegend entfernt, dann durch einen Medianschnitt die Bauchhöhle von der Symphyse bis zum Sternum eröffnet. Nach Herauspräparieren des Gallenganges wurde ein Katheter hineingeschoben und durch Fadenumschlingung befestigt. Dann wurde die v. cava inferior oberhalb des Abgangs der Vv. renales angeschlungen, ebenso die a. hepatica. Anschließend erfolgte die Katheterisierung der v. portae. Danach wurde so rasch wie möglich der Thorax eröffnet, das Herz freigelegt, das rechte Herzohr angeschnitten und ein weiterer Katheter durch den rechten Vorhof in den posthepatischen Teil der v. cava inferior geschoben und fixiert. Nun wurden die vorher angeschlungene v. cava inferior und die a. hepatica unterbunden. Gleich danach schlossen wir die noch in situ befindliche Leber an den Perfusionskreislauf an. Die Zeit zwischen dem Einführen des Pfortaderkatheters und dem Anschließen der Leber an den Perfusionskreislauf darf wegen der Ischämie der Leber nicht lange dauern. Sie betrug bei unserer Präparationstechnik höchstens 5 Min..

Nach Anschluß der Leber an den Perfusionskreislauf ließen wir das Organ zunächst etwa 20 min. zur Überwindung des "anaeroben Status" (HOHORST u. Mitarb. 1959) und Herstellung eines hämodynamischen Gleichgewichtes

---

+) Frl. J. Ahamer, med.-techn. Assistentin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, danke ich für ihre präparative Hilfe.

leer durchströmen. Gleichzeitig wurde für eine Temperatur von 37° C gesorgt. Nach dieser Zeit wurde der erreichte Durchfluß gemessen, Blut zur Bestimmung des Laktat/Pyruvat-Quotienten sowie zur Bestimmung des Hämoglobin entnommen und die gewünschte Menge Tetrahydrofolsäure zugegeben. Nach 15 Min. wurden 0,4 ml 10 %iges Na-Formiat zugefügt. Von dieser Zeit an wurde nach 15, 30, 45 und 60 Min. der Durchfluß pro Minute gemessen, 4 ml Blut entnommen, zentrifugiert und der Ameisensäuregehalt im Überstand bestimmt.

Um die Funktionstüchtigkeit der Leber während des Versuches zu überwachen, wurde der Laktat/Pyruvat-Quotient zu Beginn und am Ende des Versuches gemessen. Weiterhin haben wir routinemäßig den Hämoglobingehalt des Perfusionsblutes und dessen Hämatokrit, sowie den Gallefluß bestimmt. Während des ganzen Versuches mußten Temperatur des Perfusionsraumes, O_2-Durchfluß durch das System sowie die Drehgeschwindigkeit der Blutförderungspumpe konstant bleiben.

Im allgemeinen fanden unsere Versuche mit der isoliert-perfundierten Leber unter folgenden Bedingungen statt:

a) Der Perfusionsfluß lag zwischen 8 und 13 ml/min, wobei der Fluß normalerweise bis etwa 45 Min nach Versuchsbeginn zunahm und dann langsam abfiel.
b) Der Gallefluß betrug 1,0 - 1,5 ml/3 Std .
c) Der Sauerstoffdurchfluß durch das System wurde bei 0,25 l/min eingestellt.
d) Der Hämatokrit bewegte sich zwischen 30 und 35 %.
e) Das Hämoglobin betrug 11,0 - 12,0 %.
f) Die Laktat/Pyruvat-Quotienten lagen am Beginn des Versuches bei 12,1 und am Ende bei 12,3 im Mittel.

Diese Bedingungen sind nach Angaben von SCHIMASSEK (1963), FORSANDER (1968) und KREBS (1968) als normal zu bezeichnen. Das Prinzip der von uns benützten Perfusionsapparatur beruht auf der von SCHIMASSEK (1963) angegebenen Anordnung, die ihrerseits auf MILLER u. Mitarb. (1951) zurückgeht.

Das Perfusionsmedium enthielt folgende Zusammensetzung:

1) Nährlösung nach KREBS-HENSELEIT (Reagenzien siehe THER 1965) mit einem Zusatz von 5 Teilen 5, 4 %iger Glukose.
2) 1, 5 g Serumalbumin vom Rind trocken, "reinst" der BEHRINGWERKE AG. Dieser Serumalbumin wurde in 60 ml Nährlösung aufgelöst und dann mit Nährlösung auf 100 ml aufgefüllt.
3) Frische Rindererythrozyten, die zweimal in 0, 9 %ige Kochsalzlösung und einmal in der Nährlösung gewaschen wurden.

c) Isolierung der Dihydrofolatreduktase :

Lebern von jungen Ratten werden bei 0° C entnommen und gewogen. Die Lebern werden mit eiskalter Saccharose-Lösung, die 0, 002 M. Trispuffer enthält, homogenisiert (pro Gramm Leber 3 ml Saccharose Trispuffer-Lösung) und 15 min bei 140 Umdrehungen/min und 0° C zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand 70 Min. bei 30 000 Umdrehungen pro Minute, 0° C und Vacuum von 100 Micron in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Der abpipettierte Überstand enthält Dihydrofolat-Reduktase. Der Überstand wird bei 0° C aufbewahrt.

d) Analytische Methoden :

1) Bestimmung der Dihydrofolatreduktase-Aktivität

Die Folatreduktaseaktivität im Leberextrakt bestimmten wir mittels eines von MATHEWS u. Mitarb. (1963) angegebenen und von uns modifizierten Verfahrens, welches auf folgendem Prinzip beruht:

$$\text{Dihydrofolat} + \text{NADPH} + H^{+} \longleftrightarrow \text{Tetrahydrofolat} + \text{NADP}^{+}$$

Dihydrofolatreduktase vermag mit Hilfe von NADPH die Umwandlung von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat zu katalysieren. Die Reaktion ist reversibel. Bei pH 5, 4 liegt das Gleichgewicht weitgehend zugunsten der rechten Seite und kommt fast vollends zustande. Die Abnahme der Extinktion bei

340 mμ wird dazu benutzt, die Umwandlung von NADPH in $NADP^+$ zu verfolgen.

Reagenzien:

1, 1) Saccharose-Trispuffer-Lösung, pH 7, 5:

Saccharose 8, 56 g

Trispuffer 24, 2 mg

mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen.

1, 2) Zitratpuffer, pH 5, 4:

Lösung A: 2, 100 g Zitronensäure und

20, 0 ml 1 n Na OH

mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen.

Lösung B: 0, 1 n Na OH.

23, 5 ml Lösung B + 76, 5 ml Lösung A werden auf pH 5, 4 eingestellt.

1, 3) Dihydrofolsäure:

1 Gramm Folsäure wird in 100 ml Wasser suspendiert und durch Zutropfen von 1 n KOH in Lösung gebracht. Dann werden 250 ml 10 %ige Kaliumacetatlösung (pH = 6) und 10 g Na-dithionit zugegeben, 5 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann auf 0° C abgekühlt und das pH durch Zusatz von 25 %iger HCl auf 2, 8 gebracht. Die dabei als seidenglänzender Niederschlag ausfallende Dihydrofolsäure wird abzentrifugiert, unter Rühren in 250 ml Kaliumascorbat suspendiert und die Fällung mit 2 n HCl wiederholt. Der Rückstand wird 4 mal mit 0, 005 n HCl gewaschen und abzentrifugiert. Der Bodensatz wird gefriergetrocknet und die Dihydrofolsäure als Pulver bei Schutz vor Licht und Luft kühl aufbewahrt. 4, 434 mg Dihydrofolsäure werden in 10 ml Aqua bidest. suspendiert (0, 1 μMol/0, 1 ml) und mit Hilfe von 0, 1 n NaOH in Lösung gebracht.

1, 4) Mercaptoäthanol:

58, 589 mg in 10 ml Aqua bidest. entspricht 15 μMol/0, 2 ml.

1, 5) NADPH: 3, 727 mg in 1 ml Aqua bidest. (1, 0 µMol/0, 1 ml)

Reaktionsansatz:

	Probe (a)	Vergleichsprobe (b)	Leerwert
Citratpuffer	1, 55 ml	1, 65 ml	1, 7 ml
Merceptoäthanol (15 µMol)	0, 2 ml	0, 2 ml	0, 2 ml
Dihydrofolsäure 0, 1 µMol	0, 1 ml	-	-
NADPH 0, 5 µMol	0, 05 ml	0, 05 ml	-
Enzym	0, 1 ml	0, 1 ml	0, 1 ml
Küvetteninhalt	2, 0 ml	2, 0 ml	2, 0 ml

Probe und Vergleichsprobe werden gegen den Leerwert über 12 Minuten im Zeiss-Photometer bei 340 mµ gemessen. Die Extinktionswerte für eine typisch verlaufende Reaktion sind im folgenden tabellarisch zusammengestellt.

Zeit	Ext. Probe	Ext. Vergleichsprobe
1	0, 740	0, 390
2	0, 700	0, 385
3	0, 670	0, 380
4	0, 640	0, 375
5	0, 610	0, 370
6	0, 580	0, 370
7	0, 550	0, 365
8	0, 530	0, 365
9	0, 510	0, 365
10	0, 480	0, 360
11	0, 450	0, 355
12	0, 420	0, 350

Die Werte werden in ein Koordinatensystem eingetragen und zwar als Ordinate die Extinktion und als Abszisse die Zeit in Minuten. Durch die erzielten Punkte wird eine Linie gezogen. Anschließend wird die Extinktionsänderung pro Minute abgelesen (Abb. 1).

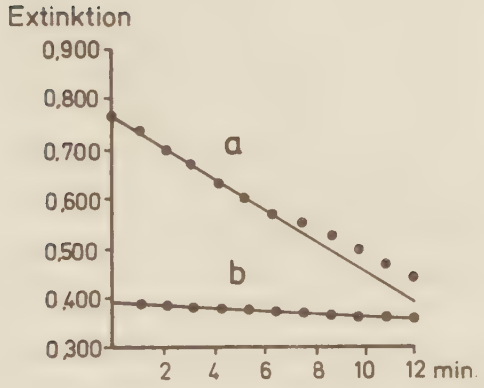

Abb. 1: Messung der Dihydrofolatreduktaseaktivität.

Meßstrahlung: 340 mμ, Schichtdicke 1 cm,
Meßvolumen: 2 ml, Raumtemperatur.

a = Probe, b = Vergleichsprobe.

Berechnung:

$$\frac{(\text{Extinktion a/Min.})-(\text{Extinktion b/Min.}) \cdot 0,1613 \cdot 1000 \cdot 2}{\text{g\% Eiweiß}} =$$

mμg FH_4/mg/min

Z.B.: $\frac{(0,0315) - (0,0030) \cdot 0,1613 \cdot 1000 \cdot 2}{1,7} = 5,4$ mμg FH_4/mg/min.

Der Eiweißgehalt wurde mit Hilfe des Biuretreagenz bestimmt. In einem Reagenzglas werden 4, 9 ml 0, 9 %ige NaCl-Lösung, 0, 1 ml Leberextrakt und 5 ml Biuretreagenz pipettiert, gut gemischt und 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wird die Extinktion gegen den Leerwert (5 ml 0, 9 %ige NaCl-Lösung + 5 ml Biuretreagenz) im Eppendorf-Photometer bei einem Filter von 546 mμ gemessen. Der Eiweißgehalt wird anschließend in mg% aus einer Eichkurve abgelesen.

2) Isolierung und Bestimmung von Methanol im Harn

Abtrennung des Methanols:

Wir bedienen uns hierbei der von KLINGMÜLLER u. Mitarb. (1955) angegebenen Methode der Wasserdampf-Destillation zur Schnellbestimmung wasserdampfflüchtiger Stoffe mit einer Ganzglasapparatur. Es werden dabei 0, 2 ml Harn mit 5, 8 ml Aqua bidest. verdünnt und der Wasserdampfdestillation unterzogen. Vom Destillat werden die ersten 20 ml aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung dicht verschlossen aufbewahrt.

Bestimmung des Methanols:

Die verwendete Methode beruht auf dem Prinzip der Oxydation von Methanol zu Formaldehyd durch phosphorsaure, gesättigte Kaliumpermanganatlösung. Der Formaldehyd wird als Komplex mit Chromotropsäure (1, 8 dioxynaphtalin-3, 6-disulfonsäure) bestimmt.

Reagenzien:

1. Gesättigte Kaliumpermanganatlösung
   Zur Herstellung werden 2, 5 ml o-Phosphorsäure mit Aqua bidest. auf 50 ml aufgefüllt, hierzu 2, 6 g Kaliumpermanganat gegeben. Die Lösung wird nach 8 - 10 Tagen filtriert und läßt sich gut verschlossen über mehrere Wochen aufbewahren.

2. Schwefeldioxyd (aus wasserfreiem Natriumbisulfit und 80 % H_2SO_4)

3. 80 %ige Schwefelsäure

4. Chromotropsäure

   Zu ihrer Herstellung werden 250 mg Chromotropsäure in 20 ml Aqua bidest. gelöst und mit 80 %iger Schwefelsäure auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung ist im Dunkeln für einige Tage haltbar.

Durchführung:

3 ml Destillat werden in ein Reagenzglas pipettiert und mit 1 ml gesättigter Kaliumpermanganatlösung versetzt. Der Ansatz bleibt 5 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Anschließend wird durch Einleitung von Schwefeldioxyd der Überschuß an Kaliumpermanganat aus dem Ansatz entfernt.
Zu der entfärbten Lösung gibt man 1 ml Chromotropsäure und 5 ml 80 %ige Schwefelsäure, durchmischt mittels eines Glasstabes und erhitzt die Proben 30 Minuten im kochenden Wasserbad.
Man kühlt die Ansätze unter fließendem Wasser auf Zimmertemperatur ab und mißt im Eppendorf-Photometer nach Vorschalten des Filters Hg-578 mμ. Als Vergleichslösung dient eine analog hergestellte Probe, die statt 3 ml Destillat 3 ml Aqua bidest. enthält.
Aus den abgelesenen Extinktionen im Photometer wird dann der Methanolgehalt nach folgender Gleichung errechnet.

$$\text{Methanol in Harn in mg\%} = \frac{\text{Extinktion} \times 1000 \times 0,889}{2}$$

3) Isolierung und Bestimmung von Ameisensäure im Harn

Abtrennung der Ameisensäure:

Zur Isolierung der Ameisensäure aus Harn dient die Wasserdampfdestillation mittels der Ganzglasapparatur zur Schnellbestimmung wasserdampfflüchtiger Stoffe nach KLINGMÜLLER u. Mitarb. (1955). Das pH des Harns wird mittels 25 %iger HCl bis auf 1, 9 herabgesetzt. Dann werden 6 ml in den Destille einpipettiert und das Destillat in einem 100 ml Kolben aufgefangen.

Bestimmung der Ameisensäure:

Die Bestimmung erfolgt nach der von RIETBROCK u. HINRICHS (1964) angegebenen Methode. Deren Prinzip liegt in der Reduktion der Ameisensäure zu Formaldehyd und dessen Bestimmung als Komplex mit Chromotropsäure.

Reagenzien:

1. Magnesium, Bandform, 3 mm mal etwa 0, 2 mm (Firma Riedel de Haen). 600 mg Magnesiumband werden in vier ungefähr gleich große Spiralen gewickelt, die unmittelbar vor Beginn des Reduktionsvorganges mit einem gebogenen Glasstab zum Zwecke der Entfernung von anhaftenden Karbonatresten kurz in 25 %iges HCl getaucht werden.
2. 25 % HCl
3. 80 % Schwefelsäure (hergestellt aus konzentrierter H_2SO_4)
4. 0, 25 % Chromotropsäure (250 mg kristalline Substanz werden in 20 ml Aqua bidest. gelöst und mit 80 %iger Schwefelsäure auf 100 ml aufgefüllt).

Ausführung:

10 ml Destillat und vier kurz zuvor gereinigte Magnesiumspiralen werden in einen 25 ml Erlenmeyer-Kolben gegeben. Nach fraktionierter Zugabe von 25 %iger HCl-Lösung, je 0, 25 ml pro Minute, entwickelt sich bei

gleichzeitiger Kühlung im Eisbad naszierender Wasserstoff. Es werden 7,5 ml HCl in 30 Portionen von 0,25 ml zupipettiert. Nach jeweils 10 x 0,25 ml wird der Reduktionsvorgang für 5 Minuten unterbrochen, so daß der gesamte Vorgang nach 37 Minuten abgeschlossen ist. Die Kölbchen werden aus dem Eisbad genommen und die völlige Lösung der Magnesiumreste bei Zimmertemperatur abgewartet. Eine Kontrollösung enthält 10 ml Aqua bidest. statt Destillat.

Der bei der Reduktion entstandene Formaldehyd wird mit Chromotropsäure quantitativ bestimmt, indem man jeweils 4 ml der Reduktionslösung mit 1 ml 0,25 %iger Chromotropsäure und 5 ml 80 %iger Schwefelsäure versetzt. Die Proben werden nach Durchmischung mit dem Glasstab 30 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt, anschließend unter fließendem Wasser auf Zimmertemperatur abgekühlt und im Eppendorf-Photometer nach Vorschalten des Filters Hg 578 mμ gegen den Leerwert gemessen. Zum Schluß wird nach der Gleichung

$$\text{Ameisensäure in Harn in mg\%} = \frac{\text{Extinktion} \cdot 100 \cdot 3,12}{\text{vorgelegte Harnmenge}}$$

die ausgeschiedene Ameisensäure in mg% errechnet.

4) Bestimmung von Laktat

Zur Bestimmung von Laktat wurde die von HOHORST (1962) angegebene Methode verwendet. Dieser Methode liegt folgendes Prinzip zugrunde: Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert die Dehydrierung von L-Laktat durch NAD:

$$\text{L-Laktat} + NAD^+ \longleftrightarrow \text{Pyruvat} + NADH + H^+$$

Die Extinktionszunahme durch NADH-Bildung läßt den Reaktionsablauf spektrophotometrisch verfolgen. Die Extinktion wird im Eppendorf-Photometer nach Vorschalten eines Hg-Filters von 366 nm gemessen. (Reagenzien und Durchführung siehe U.V. Test mit LDH, BOEHRINGER, Best. Nr. 15972 TLAA.)

5) Bestimmung von Pyruvat

KUBOWITZ u. OTT (1943) haben erstmals eine Methode zur Pyruvatbestimmung entwickelt, der folgendes Prinzip zugrunde liegt:
LDH katalysiert die Hydrierung von Pyruvat mit reduziertem NADH.

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longleftrightarrow \text{Laktat} + \text{NAD}^+$$

Da NADH sehr rasch in NAD^+ umgewandelt werden will, wird bei Überschuß von NADH schnell Pyruvat quantitativ in Laktat übergeführt. Deshalb liegt das Gleichgewicht der Reaktion weitgehend zugunsten der rechten Seite. Die Abnahme der NADH-Extinktion erlaubt uns, den Reaktionsverlauf zu verfolgen.
(Reagenzien und Durchführung siehe U.V.Test mit LDH, BOEHRINGER, Best.Nr. 15973 TPAA.)

6) Hämoglobinbestimmung

Das Hämoglobin wurde mit der von BETKE u. Mitarb. (1950) sowie DANNENBERG (1957) ausgearbeiteten Methode ("Cyanhämoglobin-Methode") bestimmt.
Das Prinzip dieser Methode basiert auf folgender Grundlage:
Eine Transformationslösung, die Kaliumhexacyanoferrat (III) und Kaliumcyanid enthält, führt das Hämoglobin in das stabilere Cyanhämoglobin über. Die Farbänderung bei dieser Reaktion erlaubt uns durch Extinktionsmessung den Reaktionsablauf zu verfolgen. Die Extinktion bestimmen wir in 10 mm Küvetten bei 546 mμ im Photometer Eppendorf.
(Reagenzien siehe in Photometrische Methoden, Medizin, Eppendorf 1965, AV 830).
Der Hämatokrit wurde mit der von HEDIN angegebenen allgemein üblichen Methode bestimmt.

D. ERGEBNISSE

a) Beeinflussung der Folatreduktaseaktivität der Rattenleber durch Amethopterin und Folsäure

1) Amethopterin

Das Ziel unserer Untersuchungen war es, zu klären, ob Amethopterin die Folatreduktase nach Vorbehandlung der Tiere mit Amethopterin vollständig über eine gewisse Zeit blockiert und ob die Hemmung reversibel ist. Ferner sollte ermittelt werden, wann die Folatreduktase ihre ursprüngliche Aktivität wieder erreicht hat. In einer Versuchsreihe von insgesamt 55 Ratten, im Gewicht von 57 g, applizierten wir den Tieren 5 mg/kg Amethopterin "Methotrexat-Lederle" i.p. Nach 6 bis 168 Stunden wurden die Ratten getötet und anschließend die Aktivität der Folatreduktase der Leber bestimmt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind aus Abb. 2 zu ersehen. Diese zeigt, daß es möglich ist, die Aktivität der Folatreduktase nach Gabe von 5 mg/kg Methotrexat i.p. über 12 Stunden praktisch komplett zu hemmen. 18 Stunden nach Methotrexatzufuhr steigt die Folatreduktaseaktivität der Rattenleber linear an und hat nach 168 Stunden ihre ursprüngliche Höhe fast wieder erreicht.

2) Folsäure

In einer weiteren Versuchsserie sollte gezeigt werden, daß es nicht nur möglich ist, durch Zufuhr von Amethopterin die Folatreduktase zu hemmen, sondern auch durch Gabe von Folsäure die Aktivität des Folatreduzierenden Enzymsystems passager zu erhöhen. Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, ist die Folatreduktaseaktivität der Leber bereits 24 Stunden nach der ersten Folatgabe von 10 mg/kg i.p. um 0,55 mµg FH_4/mg/min gegenüber der der Kontrolltiere erhöht. Nach weiteren Gaben von jeweils 10 mg/kg an den zwei darauffolgenden Tagen bleibt die erhöhte Aktivität zunächst unverändert bestehen. Erst 48 Stunden nach Abschluß der

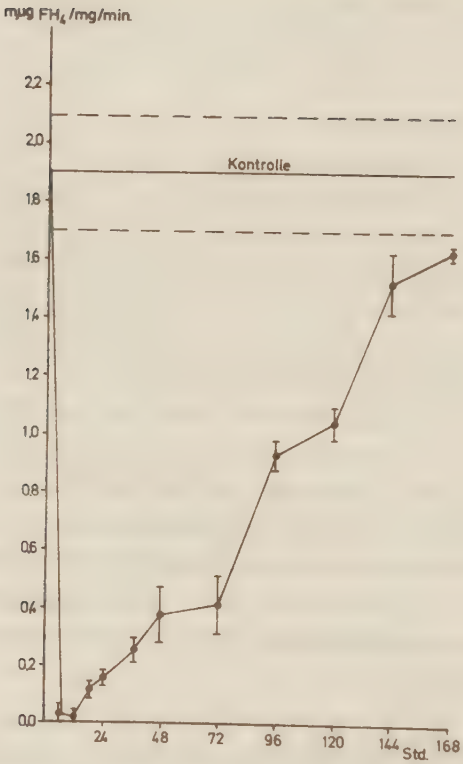

Abb. 2: Hemmung der Folatreduktase-Aktivität der Rattenleber nach Vorbehandlung mit 5 mg/kg Amethopterin i.p. Kontrolle 1, 9 $\pm$ 0, 2 mµg FH_4/mg/min.

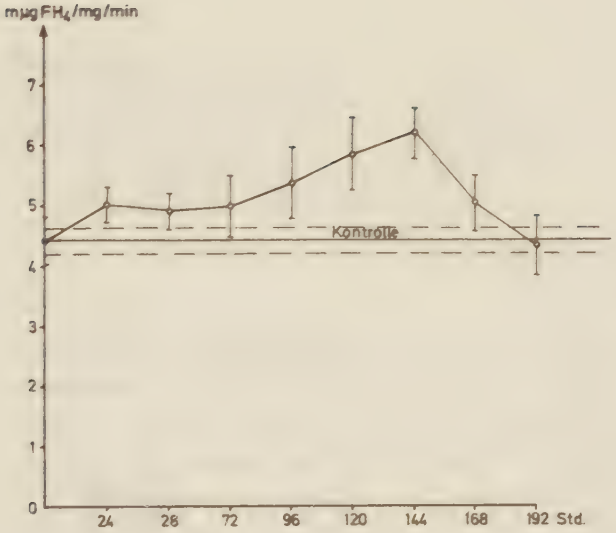

Abb. 3: Beeinflussung der Folatreduktase-Aktivität durch Folsäure. 10 mg/kg Folsäure i.p. und zwar bei 0, 24 und 48 Stunden.
Kontrolle: 4, 35 $\pm$ 0, 15 mµg FH_4/mg/min.

Folsäurebehandlung steigt die Aktivität weiter an und erreicht 144 Stunden nach Versuchsbeginn ihr Maximum mit einem Wert von 6, 18 mµg FH_4/mg/min. Die Aktivität sinkt dann an den folgenden Tagen langsam wieder auf den Ausgangswert ab.

Diese Befunde lassen demnach eine ins Gewicht fallende Beteiligung der Folsäure auch am Methanolumsatz der Ratte als möglich erscheinen. Wir haben daher die Rolle der Folsäure bezüglich der Ameisensäureelimination während der Methanolintoxikation näher untersucht.

b) Einfluß von Folsäure auf die Elimination von Methanol und Ameisensäure im Harn

In einer ersten Versuchsserie sollte ermittelt werden, ob Folsäure den Umsatz von Methanol in vivo beeinflußt. Zu diesem Zweck verabreichten wir 3 Gruppen von jeweils 24 Ratten an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 10 mg/kg Folsäure i.p. und einmalig Methanol in einer Dosis von 2 g/kg ebenfalls i.p. zu verschiedenen Zeiten (Dosierungsschema siehe Abb. 4).

Wie aus Abb. 4 ersichtlich, verhalten sich die drei Gruppen hinsichtlich der Ameisensäureelimination unterschiedlich. Vergleicht man zunächst die absolut im Urin ausgeschiedenen Mengen an Ameisensäure bei Gruppe a - Methanolzufuhr 1 Stunde nach der 1. Folsäuregabe - mit denen der Kontrollgruppe, so sieht man, daß die behandelten Tiere im Mittel nach 12 Stunden 1, 1 mg Ameisensäure weniger ausscheiden als die Kontrolltiere (Abb. 4 a). Diese schon an sich kleine Differenz verringert sich jedoch nach 24 Stunden auf nur mehr 0, 1 mg. Die bis zum Versuchsende bei der Versuchs- und Kontrollgruppe gemessenen Ameisensäuremengen im Urin sind dann annähernd gleich. Insgesamt scheiden die Versuchstiere im Mittel 1, 37 mg Ameisensäure (= 11, 3 %, bezogen auf die Gesamtausscheidung der Kontrolltiere) über den gesamten Beobachtungszeitraum von 72 Stunden weniger aus als die Kontrolltiere.

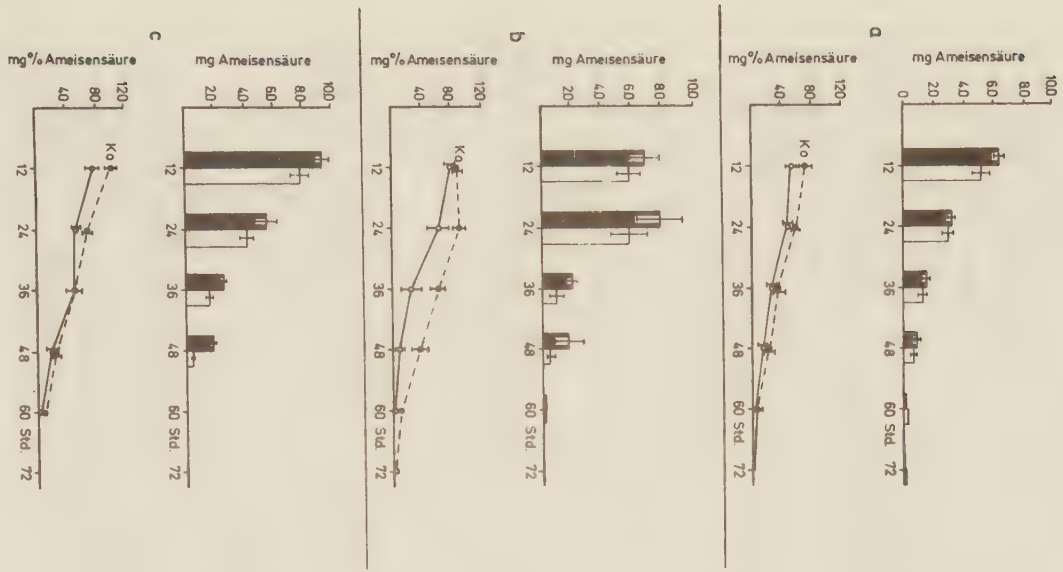

Abb. 4: Ameisensäureelimination aus dem Harn methanolvergifteter Ratten nach Folsäuregabe. ▬ Kontrolle ▭ Versuch

a) Am 1. Tag 10 mg/kg Folsäure i.p., eine Std. später 2 g/kg 30 %ige Methanolläsung i.p.. Nach 24 und 48 Stunden jeweils 10 mg/kg Folsäure i.p.

b) An 3 aufeinanderfolgenden Tagen täglich 10 mg/kg Folsäure i.p., am 4. Tag 2 g/kg 30 %ige Methanollösung i.p.

c) An 3 aufeinanderfolgenden Tagen 3 x 10 mg/kg Folsäure i.p., nach der letzten Folsäuregabe 2 g/kg 30 %ige Methanollösung i.p.

Dieser geringe Unterschied in der Ameisensäureausscheidung von Versuchs- und Kontrolltieren der Gruppe a geht auch aus dem Kurvenverlauf der Ameisensäurekonzentrationen im Harn hervor.

Versuchs- und Kontrolltiere der Gruppe b - Methanolzufuhr 24 Stunden nach der letzten Folsäuregabe - zeigen hingegen einen deutlicheren Unterschied in der Ameisensäureausscheidung. Während nach 12 Stunden die Versuchstiere nur 0, 7 mg weniger als die Kontrolltiere eliminieren, wächst diese Differenz nach 24 Stunden auf 2 mg an und ist auch noch nach 48 Stunden mit 1, 5 mg deutlich. Insgesamt scheiden die Versuchstiere während 72 Stunden 5, 39 mg Ameisensäure (= 28, 6 % bezogen auf die Gesamtausscheidung der Kontrolltiere) weniger aus als die Kontrolltiere. Diesen Unterschied in der Ameisensäureelimination spiegelt auch der Verlauf der Harnkonzentrationen an Ameisensäure von Versuchs- und Kontrolltieren wider . Versuchs- und Kontrolltiere der Gruppe c - Methanolzufuhr 72 Stunden nach der letzten Folsäuregabe - zeigen ebenfalls noch einen merklichen Unterschied. Nach 12 Stunden beträgt die Ameisensäureausscheidung bei den Kontrolltieren im Mittel 1, 4 mg mehr als bei den Versuchstieren. Eine Differenz dieser Größenordnung ist bis zum Versuchsende nachweisbar. Insgesamt eliminieren die Versuchstiere 4, 07 mg (= 22. 6 %, bezogen auf die Gesamtausscheidung der Kontrolltiere) Ameisensäure weniger im Urin als die Kontrolltiere im Verlaufe von 72 Stunden.

Aus diesen Versuchen ist zu entnehmen, daß der Zeitpunkt der Methanol- und Folsäuregabe eine wesentliche Rolle spielt. Bei Gruppe a ist eine Stunde nach der Folsäureverabreichung Methanol gegeben worden. Dieser Zeitraum ist für ein Wirksamwerden der Folsäure offensichtlich noch zu kurz. Die Gruppe b, welche 24 Stunden nach der letzten Folsäuregabe mit Methanol vergiftet worden ist, zeigt die größte Differenz zwischen Kontrolltieren und Versuchstieren. Die Wirksamkeit der Folsäure dürfte also bei Applikation zu diesem Zeitpunkt optimal sein. Die Tiere der Gruppe c sind 72 Stunden nach der letzten Folsäuregabe mit Methanol

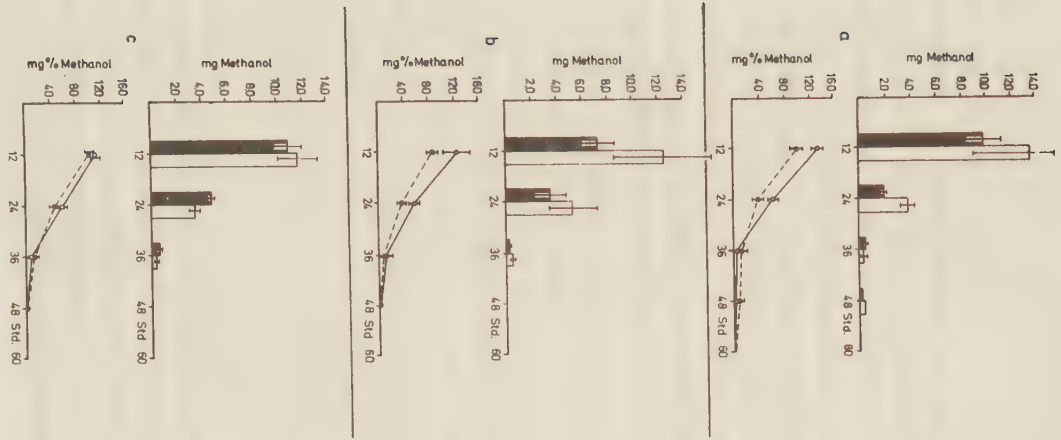

Abb. 5: Methanolelimination aus dem Harn methanolvergifteter Ratten nach Folsäuregabe.
Kontrolle Versuch

a) Am 1. Tag 10 mg/kg Folsäure i.p., eine Std. später 2 g/kg 30 %ige Methanollösung i.p. Nach 24 und 48 Std. jeweils 10 mg/kg Folsäure i.p.

b) An 3 aufeinanderfolgenden Tagen täglich 10 mg/kg Folsäure i.p., am 4. Tag 2 g/kg 30 %ige Methanollösung i.p.

c) An 3 aufeinanderfolgenden Tagen 3 x 10 mg/kg Folsäure i.p. 72 Std. nach der letzten Folsäuregabe 2 g/kg 30 %ige Methanollösung i.p.

vergiftet worden. Es zeigt sich, daß zu diesem Zeitpunkt die Wirksamkeit der Folsäure zwar etwas abgeklungen, aber doch noch deutlich nachweisbar ist.

Abb. 5 zeigt die Methanolausscheidung im Harn bei Versuchs- und Kontrolltieren der Gruppen a - c. Alle drei Versuchsgruppen eliminieren über den beobachteten Versuchszeitraum mehr Methanol als die jeweiligen Kontrollgruppen. Besonders deutlich ist dieser Unterschied in Gruppe a und b, wo die Differenz nach 12 Stunden 3,86 bzw. 5,50 mg Methanol absolut beträgt. Berücksichtigt man jedoch die Tatsache, daß infolge der diuretischen Wirkung der Folsäure die Harnvolumina bei den Versuchstieren jeweils deutlich größer als bei den Kontrolltieren sind, so ergeben sich bezüglich der Methanolelimination zwischen Versuchstieren und Kontrolltieren nur geringe Unterschiede. Dies ist auch aus dem Verlauf der Methanolharnkonzentrationen von Versuchstieren und Kontrolltieren während der Versuchsdauer ersichtlich. Eine Verschiebung der Methanolelimination wird demnach durch Folsäure nicht in nennenswertem Maße verursacht.

c) Einfluß des Folsäureantagonisten Amethopterin auf die Elimination von Methanol und Ameisensäure im Harn

Die Beschleunigung der Formiatelimination bei mit Methanol vergifteten Ratten nach Zufuhr hoher Folsäuredosen weist bereits auf die Rolle der Folsäure im Entgiftungsmechanismus hin. Umgekehrt sollte es möglich sein, durch Gabe eines Folsäureantagonisten die Elimination von Ameisensäure zu hemmen.

Wir haben in einer weiteren Versuchsreihe Ratten in einen Folsäuremangelzustand versetzt, in dem wir ihnen vor der Vergiftung mit Methanol einen Folsäureantagonisten verabfolgten. Wir benutzten Amethopterin (Methotrexat-Lederle) in einer Dosis von 5 mg/kg. Methotrexat wurde eine Stunde vor der Vergiftung verabreicht. Die Wirkung des Folsäure-

antagonisten beruht darauf, daß er eine hemmende Wirkung auf die Aktivität der Folatreduktase ausübt, wodurch eine Aktivierung des im Organismus vorhandenen bzw. zugeführten Folats zu Tetrahydrofolat blockiert wird. Eine Stunde nach Methotrexatvorbehandlung wurden die Ratten mit 4 bzw. 2 g/kg 30 %ige Methanollösung vergiftet.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind aus den Abb. 6 und 7 zu ersehen. Vorbehandlung mit Methotrexat führt bei methanolvergifteten Ratten zu einem hohen Anstieg der Ameisensäureausscheidung. So scheiden die mit 4 g/kg Methanol vergifteten Folsäuremangelratten nach 12 Stunden 10, 8 mg, die Kontrolltiere zum gleichen Zeitpunkt 6, 61 mg Ameisensäure aus. Nach 2 g/kg Methanol scheiden Versuchstiere zum gleichen Zeitpunkt 8, 44 mg, Kontrolltiere 3, 34 mg aus. Nach 48 Stunden betrug die Ausscheidung bei Kontrollratten 6, 2 mg nach 4 g/kg Methanol und 3, 2 mg Ameisensäure nach 2 g/kg Methanol, Folsäuremangeltiere eliminieren hingegen innerhalb des gleichen Zeitraumes 10 mg bzw. 8, 2 mg Ameisensäure.

Betrachtet man nun vergleichend bei Kontroll- und Versuchstieren die Ameisensäurekonzentrationskurven im Harn, so sieht man, daß die Konzentration bei mit Methotrexat vorbehandelten Tieren nach Gabe von 4 g/kg Methanol von 165, 6 mg%, 12 Stunden nach Versuchsbeginn, innerhalb weiterer 36 Stunden auf 136 mg% absinkt. Die Ameisensäurekonzentration bei den Kontrolltieren sinkt im gleichen Zeitraum von 193, 5 mg% auf 86, 4 mg% ab. Nach der 48. Stunde fallen dann die Ameisensäurekonzentrationen im Urin bei Versuchstieren wie bei Kontrolltieren etwa gleich schnell ab. Die Konzentrationszeitkurven der Ameisensäure nach 2 g/kg Methanol zeigen sowohl bei Versuchstieren als auch bei Kontrolltieren einen zwar größenmäßig unterschiedlichen, aber gleichsinnigen Verlauf. Die Ergebnisse der Methanolausscheidung bei Folsäuremangelratten und Kontrolltieren sind aus Abb. 7 zu ersehen. Eine signifikante Änderung der Methanolelimination findet bei Amethopterin vorbehandelten Tieren nicht statt. Diese ist auch nicht zu erwarten, da Folat-Coenzyme an der Methanoloxydation in nennenswertem Umfang nicht beteiligt sind.

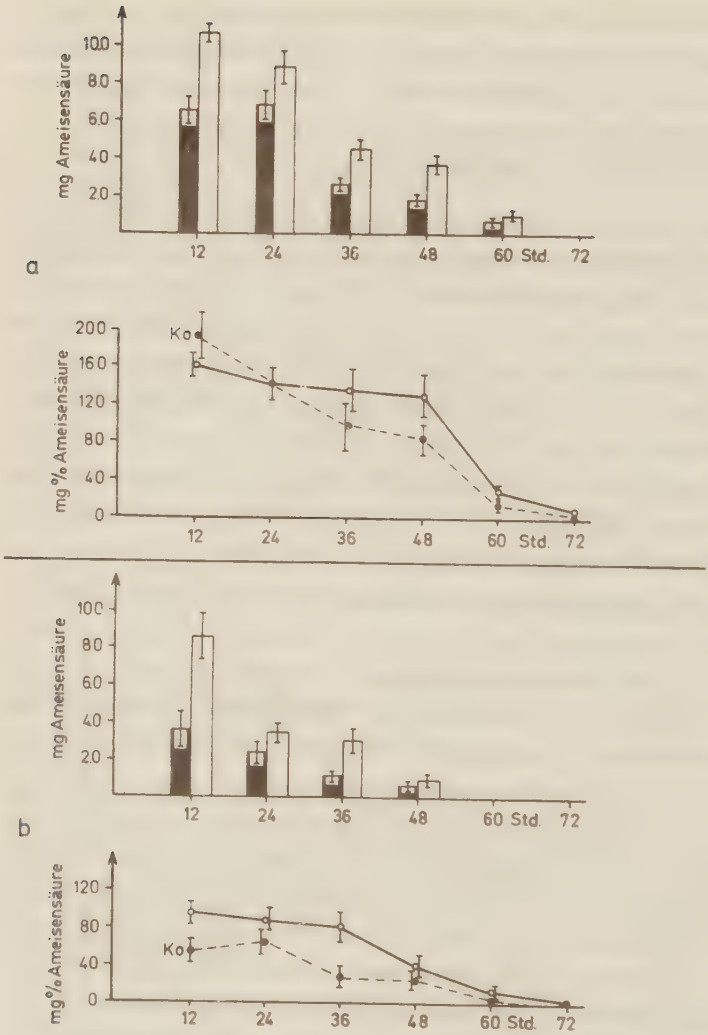

Abb. 6: Ameisensäureelimination aus dem Harn methanolvergifteter Ratten im Folsäuremangelzustand.

a) Vorbehandlung mit 5 mg/kg Methotrexat i.p., 1 Std. später 4 g/kg 30 %ige Methanollösung i.p.

b) Vorbehandlung mit 5 mg/kg Methotrexat i.p., 1 Std. später 2 g/kg 30 %ige Methanollösung i.p.

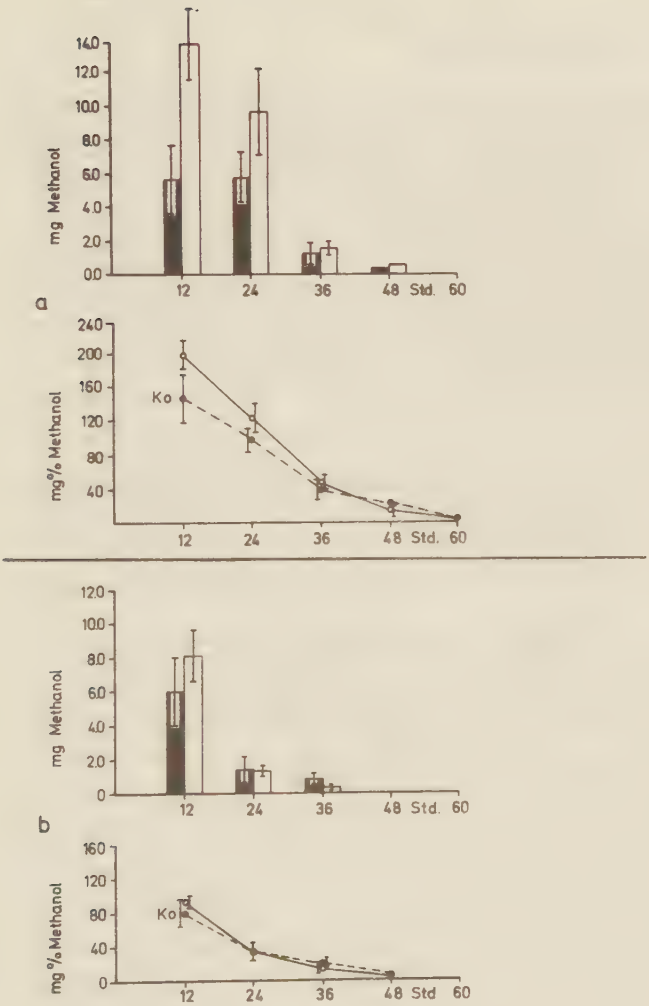

Abb. 7: Methanolelimination aus dem Harn methanolvergifteter Ratten im Folsäuremangelzustand.

a) Vorbehandlung mit 5 mg/kg Methotrexat i.p., 1 Std. später 4 g/kg 30 %ige Methanollösung i.p.

b) Vorbehandlung mit 5 mg/kg Methotrexat i.p., 1 Std. später 2 g/kg 30 %ige Methanollösung i.p.

d) Beeinflussung der Formiatoxydation in der isoliert-perfundierten Rattenleber durch Tetrahydrofolsäure

Ein weiterer Versuch an der isoliert-perfundierten Rattenleber soll die Rolle der Tetrahydrofolsäure bei der Formiatoxydation in vitro aufzeigen. Tab.1 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Innerhalb von 30 Minuten werden in der isoliert-perfundierten Rattenleber nach Zugabe von 1 mg Tetrahydrofolsäure zur Perfusionsflüssigkeit 1, 82 mval Ameisensäure, nach Zugabe von 2 mg Tetrahydrofolsäure 2, 01 mval Ameisensäure oxydiert, während beim Kontrollversuch 1, 58 mval Ameisensäure in der gleichen Zeit umgesetzt werden.

Tabelle 1: Einfluß von Tetrahydrofolsäure auf die Ameisensäureoxydation in der isoliert-perfundierten Rattenleber.
$\triangle$ = oxydierte Ameisensäure während 30 min in mval.

Gruppe	15 Min.	45 Min.	$\triangle$ mval
Kontrolle	5, 58 mval	4, 00 mval	
(n = 6)	$\pm$0, 26	$\pm$0, 51	1, 58
1 mg FH_4	5, 07 mval	3, 25 mval	
(n = 4)	$\pm$0, 23	$\pm$0, 13	1, 82
2 mg FH_4	5, 07 mval	3, 06 mval	
(n = 4)	$\pm$ 33	$\pm$0, 5	2, 01

E. DISKUSSION

Nach RIETBROCK u. Mitarb. (1966) gelingt es beim Hund durch Gabe von Folsäure die bei der Methanolvergiftung auffallende Ameisensäure beschleunigt zu eliminieren und damit das Aufteten von Vergiftungserscheinungen zu verhindern. Demgegenüber steigen beim Folsäuremangelhund die Ameisensäurewerte im Plasma bei der Methanolvergiftung auf mehr als das Doppelte an. Vorbedingung für den reibungslosen Ablauf des Entgiftungsmechanismus der Ameisensäure ist offenbar das Vorhandensein des freien Folatcofaktors, nämlich der Tetrahydrofolsäure. Die Beschleunigung der Ameisensäureelimination durch Folsäure trifft für die Ratte nur bedingt zu. Bei diesen Spezies läuft die Elimination der Ameisensäure so rasch ab - HWZ 13 min (RIETBROCK, 1965) -, daß selbst mit subletalen Dosen von Methanol keine Azidose zu erzeugen ist (RÖE, 1948; GILGER u. POTTS, 1955). Die typischen Anzeichen der Methanolvergiftung bleiben aus.

Hinsichtlich der Rolle der Folsäure beim Umsatz der Ameisensäure sind wir bei unseren Untersuchungen von der Annahme ausgegangen, daß die Kapazität des Organismus zur Entgiftung von Ameisensäure durch den aktuellen Bestand an Tetrahydrofolsäure limitiert ist. Obwohl bei der Ratte der Folatbestand von vorneherein 8-9 mal höher liegt als bei Hund und Mensch (STRATEMANN 1969), haben wir auf diese Tierart zurückgegriffen, um den Beweis zu erbringen, daß Folsäure auch bei dieser Spezies wesentlich am Umsatz der Ameisensäure mitbeteiligt ist. Wir stellten zunächst fest, daß die Folatreductase zwar durch Amethopteringabe hemmbar ist, die Aktivität dieses Enzyms jedoch sehr rasch zum Ausgangsniveau zurückkehrt. Es ist ferner früher schon darauf hingewiesen worden, daß Folsäuregabe neben einer Aufladung des Folatpools auch in einer Stimulierung folatabhängiger Enzymsysteme resultieren muß (STRATEMANN,1969). Hierfür spricht einmal die Tatsache, daß die Folatkonzentrationen an aktiven Stufen im Plasma nach Folsäuregaben nur kurzzeitig erhöht sind (STRATEMANN, 1969). Zum anderen wird auch

durch Vitamin B_{12} der Formiatumsatz beim Hund in ähnlichem Maß gesteigert wie durch Folsäure (MALORNY u. STIEREN, 1967). Nach den vorliegenden Untersuchungen findet eine derartige coenzymbedingte Enzyminduktion statt. Nach 3 maliger Gabe von 10 mg/kg Folsäure i.p. bei den Ratten steigt die Enzymaktivität 48 Stunden nach der letzten Applikation an und erreicht ungefähr nach 96 Stunden ihr Maximum. Beide Mechanismen, sowohl eine Aufladung des Folatpools durch Folsäuregabe als auch die dadurch hervorgerufene Stimulierung folatabhängiger Enzymsysteme, scheinen für die rasche Entgiftung der Ameisensäure von Bedeutung zu sein. Coenzymbedingte Enzyminduktionen ähnlicher Art sind schon früher an 4 Systemen beschrieben worden: Tryptophan - Pyrolase (GREENBERG u. FEIGELSON 1961), Tyrosin -α- Oxyglutarat - Transaminase (GREENGARD 1964), Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (BARKER 1967) sowie Pyruvatdehydrogenase (REINAUER u. Mitarb. 1968).

Da die Ratte per se über einen hohen Bestand aktivierter Folatstufen verfügt, treten nur geringfügige Änderungen der Ameisensäureausscheidung im Harn durch zusätzliche Folsäurezufuhr ein. Der Bestand an Folat ist unter normalen Bedingungen ausreichend, um die anfallende Ameisensäure im Organismus der Ratte weitgehend abzufangen. Zusätzlich ist die Formiatclearance der Niere bei der Ratte so groß, daß eine stattgefundene Oxydation des Methanols zu Ameisensäure nur am Auftreten des Formiats im Harn erkennbar wird. Aus dem Versuch läßt sich weiter entnehmen, daß der Zeitpunkt der Folsäuregabe bei der Methanolvergiftung ein wesentlicher Faktor im Entgiftungsgeschehen der Ameisensäure darstellt. Bei den Ratten, die Methanol 24 Stunden nach einer Folatapplikation von insgesamt 30 mg/kg erhielten, traten die größten Differenzen in der Ameisensäureausscheidung im Harn gegenüber Kontrolltieren auf.

Nach unseren Befunden kann die prophylaktische Gabe von Folsäure an Personen, die durch Methanol z.B. in der Industrie besonders gefährdet sind, nur empfohlen werden, zumal der Folatbestand der Gewebe von Mensch zu Mensch in weiten Grenzen schwankt (ROBINSON, 1966).

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, die Beteiligung der Folsäure als Coenzym bei der Oxydation der Ameisensäure in der Methanolvergiftung der Ratte aufzuzeigen.

Um festzustellen, welchen Einfluß Folsäure bzw. Amethopterin als Hemmstoff der Folatreduktase auf die Aktivität des folatreduzierenden Enzyms ausübt, prüften wir die Aktivität dieses Enzyms in der Leber bei mit Folsäure und Amethopterin vorbehandelten Ratten. Die Aktivität der Folatreduktase ist bereits nach einmaliger Gabe von 10 mg/kg Folsäure i.p. erhöht. Sie bleibt zunächst trotz weiterer Folatdosen von 10 mg/kg an den beiden darauffolgenden Tagen auf diesem erhöhten Niveau. 48 Stunden nach der 3. Folsäuregabe steigt die Aktivität aber weiter an, erreicht 144 Stunden nach Versuchsbeginn ihre maximale Höhe und fällt dann wieder ab. Demgegenüber ist nach einmaliger Zufuhr von 5 mg/kg Amethopterin i.p. die Folatreduktase der Leber über 12 Stunden völlig blockiert. Schon 24 Stunden nach Applikation steigt die Aktivität des Enzyms linear wieder an und erreicht nach 168 Stunden normale Werte.

Bei Belastung der Ratten mit Methanoldosen von 2 g/kg und 4 g/kg i.p. werden durch Zufuhr von Folsäure die Ameisensäurespiegel im Harn gesenkt. Hierbei erwies sich die prophylaktische Gabe von 3 x 10 mg/kg Folsäure an 3 aufeinanderfolgenden Tagen vor der Methanolvergiftung am wirksamsten.
Andererseits wird nach Vorbehandlung der Tiere mit Amethopterin vermehrt Ameisensäure im Harn ausgeschieden.

Die Oxydation der Ameisensäure in der isoliert perfundierten Rattenleber wird bei Anwesenheit von Tetrahydrofolsäure beschleunigt.

Wir schließen hieraus, daß durch Folsäuregaben eine Aufladung des Folatpools erfolgt und gleichzeitig eine Induktion folatabhängiger Enzyme ausgelöst wird. Beide Mechanismen sind offenbar an der beschleunigten Entgiftung der Ameisensäure bei der Methanolvergiftung beteiligt.

Herrn Priv. Doz. Dr. N. Rietbrock danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. D. Henschler gilt mein Dank für die Überlassung der Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut und die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn U. Abshagen, Fräulein J. Ahamer und Frau Löbel danke ich für ihre Hilfe in technischen Fragen.

G. LITERATURVERZEICHNIS

AEBI, H., H. KOBLET u. J. P. v. WARTBURG:	Helv. physiol. pharmacol. Acta 15, 384 (1957)
AEBI, H., T. STOCKER u. M. EBERHARDT:	Biochem. Z. 336, 526 (1963)
AGNER, K. u. K. E. BELFRAGE:	Acta physiol. scand. 13, 87 (1947)
ADLER, P., W. BUSCHKE u. T. GORDONOFF:	Arch. int. Pharmacodyn. 59, 416 (1938)
ARNSTEIN, H. V. R.:	Biochem. J. 47, 18 (1950)
ASSER, E.:	Z. exp. Path. Ther. 15, 322 (1914)
ATKINSON, H. V.:	J. Pharmacol. exp. Ther. 25, 144 (1925)
BALL, E. W. u. C. GILES:	J. clin. Patholog. 17, 165 (1964)
BARKER, K. L.:	Endocrinology 81, 791 (1967)
BARTLETT, G. R.:	Amer. J. Physiol. 163, 614 (1950)
BASTRUP, J. T.:	Acta pharmacol. (Kbh.) 3, 312 (1947)
BENNET, M. A.:	Science 110, 589 (1949)
BENNETT, I. L., F. H. CARY, G. L. MITCHELL u. M. N. COOPER:	Medicine (Baltimore) 32, 431 (1953)
BENTON, C. D. u. F. P. CALHOUN:	Trans. Amer. Acad. Ophthal. Otolaryng. 56, 875 (1952)
BETKE, K. u. W. SAVELSBERG:	Biochem. Z. 320, 431 (1950)

BERTINO, J.R., B.W. CABRIO u. F.M. HUENNEKENS:	Biochem. biophys. Res. Commun. 3, 461 (1960)
BERTINO, J.R., B.A. BOOTH, A.L. BIEBER, A. CASHMORE u. A.C. SARTORELLI:	J. biol. Chem. 239, 479 (1964)
BILDSTEIN, N.:	Biochem. Z. 146, 361 (1924)
BLAKLEY, R.L. u. B.M. Mc DOUGALL:	J. biol. Chem. 236, 1163 (1961)
BONGERS, P.:	Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 35, 426 (1895)
BRODE, E. u. L. JAENICKE:	Biochem. Z. 334, 328 (1961)
BRÜCKNER, H.:	Z. Gew. Hyg. 1, 17 (1924)
BÜRGER, L.:	Berl. klin. Wschr. 2, 1705 (1912)
BÜRSTENBINDER, R.:	Pharmazie 1, 257 (1946)
CARPENTER, F.H.:	Acta chem. scand. 5, 406 (1951)
CHANARIN, J.:	Lancet 2, 634 (1959)
CHANARIN, J.:	Brit. med. J. 1, 480 (1965)
CHANCE, B.:	Acta chem. scand. 1, 236 (1947)
CHANCE, B.:	Nature (Lond.) 161, 914 (1948)
CHEW, W.B., E.H. BERGER, O.A. BRINES u. M.J. CAPRON:	J. Amer. med. Ass. 130, 61 (1946)
DANNENBERG, E.:	Das ärztliche Labor 3, 205 (1957)
DINNING, J.S., C.K. KEITH, P.L. DAY u. S.R. TROTTER:	Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 72, 262 (1949)

DRYSDALE, G.R., G.W.E. PLAUT u. H.A. LARDY: J. biol. Chem. 193, 533 (1951)

Du VIGNEAUD, V. u. W. VERLY: J. Amer. chem. Soc. 72, 1049 (1950)

Du VIGNEAUD, V., W. VERLY, J.E. WILSON, J.R. RACHELE, Ch. RESSLER u. J.M. KINNEY: J. Amer. chem. Soc. 73, 2782 (1951)

EGG, C.: Schweiz. med. Wschr. 8, 5 (1927)

ERLANSON, P., H. FRITZ, K.E. HAGSTAM, B. LILJENBERG, N. TRYDING u. G. VOIGT: Acta med. Scand. 177, 393 (1965)

FLURY, F. u. W. WIRTH: Arch. Gewerbepath. 7, 221 (1936)

FORSANDER, O.A.: In: Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber, Hrsg. W. Staib, K.R. Scholz, Springer Verlag Berlin (1968)

FRIEDMAN, B., H.I. NAKADA u. S. WEINHOUSE: J. biol. Chem. 210, 413 (1954)

FÜHNER, H.: Arch. exp. Path. Pharm. 52, 69 (1905)

FUTTERMAN, S.: J. biol. Chem. 228, 1031 (1957)

GETTLER, A.O. u. A.V.ST. GEORGE: J. Amer. med. Ass. 70, 145 (1918)

GILGER, A.P. u. A.M. POTTS: Amer. J. Ophthal. 39, 63 (1955)

GORDON, A.H., D.E. GREEN u. V. SUBRAHMANYAN: Biochem. J. 34, 764 (1940)

GREENBERG, G.R.: Fed. Proc. 10, 129 (1951)

GREENBERG, G.R.: Fed. Proc. 13, 745 (1953)

GREENBERG, G.R.: J. Amer. chem. Soc. 76, 1458 (1954)

GREENGARD, O. u. P.F. FEIGELSON: Nature (Lond.) 190, 446 (1961)

GREENGARD, O. u. P.F. FEIGELSON: J. biol. Chem. 236, 158 (1961)

GREENGARD, O.: Adv. Enzyme Reg. 2, 277 (1964)

HAGGARD, H.W. u. L.A. GREENBERG: J. Pharmacol. exp. Ther. 66, 479 (1939)

HARNACK, E. v.: Dtsch. med. Wschr. 8, 358 (1912)

HARROP, G.A. u. E.M. BENEDICT: J. Amer. med. Ass. 74, 25 (1920)

HASSAN, A., M.I. ELGHAMRY u. F.M. ABDEL-HAMID: Experientia (Basel) 22, 85 (1966)

HASSAN, A., M.I. ELGHAMRY u. T.M. ABDEL-HAMID: Canad. J. Physiol. 45, 29 (1967)

HELLWIG, H.: Inaug.-Diss. Hamburg (1940), S. 11
Ber. ges. Physiologie 123, 659 (1941) (Referat)

HERBERT, V.: Arch. intern. Med. 110, 649 (1962)

HERBERT, V.: Proc. roy. Soc. Med. 57, 377 (1964)

HERKEN, W. u. N. RIETBROCK: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 260, 142 (1968)

HIBBARD, B.M.: J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 71, 529 (1964)

HOHORST, H.J., F.H. KREUTZ u. T. BÜCHER: Biochem. Z. 332, 18 (1959)

HOHORST, H. J.:	In: Methoden der Enzymatischen Analyse, Hrsg. H. u. Bergmeyer Verlag-Chemie Weinheim (1962)
HOWES, J. F. u. W. H. HUNTER:	J. Pharm. (Lond.) 20, 107 (1968)
JACOBSON, E.:	Nature (Lond.) 169, 645 (1952 a)
JACOBSON, E.:	Pharmacol. Rev. 4, 107 (1952 b)
JAENICKE, L. u. C. KUTZBACH:	Fortschr. Chem. org. Naturst. 21, 183 (1963)
JONSSON, S. u. W. A. MOSHER:	J. Amer. chem. Soc. 72, 3316 (1950)
KANE, R. L., W. TALBERT, I. HARLAN, G. SIZEMORE u. S. CATALAND:	Arch. environm. Hlth. 17, 119 (1968)
KAPLAN, K.:	Amer. J. med. Sci. 244, 170 (1962)
KAUFMAN, S.:	J. biol. Chem. 239, 332 (1964)
KEESER, E.:	Dtsch. med. Wschr. 57, 398 (1931 a)
KEESER, E.:	Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 160, 687 (1931 b)
KEESER, E. u. E. VINCKE:	Klin. Wschr. 19, 583 (1940)
KEESER, E. u. J. ALBERTY:	Klin. Wschr. 26, 212 (1948)
KEILIN, D. u. E. F. HARTREE:	Proc. roy. Soc. B. 119, 141 (1939)
KEILIN, D. u. E. F. HARTREE:	Biochem. J. 39, 293 (1945)
KENDAL, L. P. u. A. N. RAMANATHAN:	Biochem. J. 54, 424 (1954)
KINI, M. M. u. J. R. COOPER:	Biochem. J. 82, 164 (1962)

KLAUER, H.: Dtsch. Z. ges.gerichtl. Med. 30, 280 (1938)

KLINGMÜLLER, V., G. J. ERDMANN-MÜLLER, J. G. RAUSCH-STROOMANN u. G. BRUNE: Arzneimittel-Frosch. 5, 105 (1955)

KOIVUSALO, M.: Acta physiol. scand. 39, suppl. 131 (1956)

KREBS, A. H.: In: Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber, Hrsg. W. Staib u. R. Scholz, Springer-Verlag Berlin 1968

KUBOWITZ, F. u. P. OTT: Biochem. Z. 314, 94 (1943)

KUHNT, H.: Z. Augenh. (Berlin) 1, 38 (1899)

KUNIYOSHI, T.: Z. ges. gerichtl. Med. 46, 295 (1957) (Referat)

LEAF, G. u. L. J. ZATMAN: Brit. J. ind. Med. 9, 19 (1952)

LEO, H.: Dtsch. med. Wschr. 51, 1062 (1925)

LOEWENSTEIN, L., C. PICK u. N. PHILPOTT: Amer. J. Obstet. Gynec. 70, 1309 (1955)

LUND, A.: Acta pharmacol. (Kbh.) 4, 99 (1948 a)

LUND, A.: Acta pharmacol. (Kbh.) 4, 108 (1948 b)

LUND, A.: Acta pharmacol. (Kbh.) 4, 205 (1948 c)

LUTWAK-MANN, C.: Biochem. J. 32, 1364 (1938)

MACHLIN, L. J., C. A. DENTON u. H. R. BIRO: Fed. Proc. 10, 388 (1951)

MALORNY, G., N. RIETBROCK u. M. SCHNEIDER: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 250, 419 (1965)

MALORNY, G. u. B. STIEREN:	Med. Pharmacol. exp. 17, 315 (1967)
MANNERING, G. J. u. R. E. PARKS:	Science 126, 1241 (1957)
MARSH, W. H.:	J. biol. Chem. 190, 633 (1951)
MATHEWS, M. B. u. B. VENNESLAND:	J. biol. Chem. 186, 667 (1950)
MATHEWS, M. B., K. G. SCRIMGEOUR u. F. M. HUENNEKENS:	Colowick Kaplan: Methodes in Enzymology VI: 364 (1963)
MAYER (zit. bei GETTLER u. GEORG):	J. Amer. med. Ass. 70, 145 (1918)
MILLER, C. L., C. L. BLY, M. L. WATSON u. W. F. BALE:	J. exp. Med. 94, 431 (1951)
MISRA, D. K., S. R. HUMPHREYS, M. FRIEDKIN, A. GOLDIN u. E. I. CRAWFORD:	J. Nature 189, 38 (1961)
MITOMA, C. u. E. E. SNELL:	Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 41, 891 (1955)
MITOMA, C. u. S. UDENFRIED:	J. Pharmacol. exp. Ther. 113, 40 (1955)
MORGAN, E. J., C. P. STEWART u. F. G. HOPKINS:	Proc. roy. Soc. B 109, 1394 (1922)
MORGAN, E. J.:	Biochem. J. 20, 1282 (1926)
NAKADA, H. J. u. S. WEINHOUSE:	Arch. Biochem. 42, 257 (1953)
NATH, R. u. D. M. GREENBERG:	Biochemistry 1, 435 (1962)
NEELY, W. B.:	Biochem. Pharmacol. 13, 1137 (1964)

NEYMARK, M.:	Skand. Arch. Phsiol. 73, 227 (1936)
NICHOL, C.A. u. A.D.WELCH:	Proc. Soc. exp. Biol. 47, 403 (1950)
NICLOUX, M. u. A.PLACET:	J. Physiol. Path. gén 14, 916 (1912)
OGATA, S., T.HOSOI, H.SAPI u. K.MORITA:	Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 54, 181 (1963/64)
OPHTH. RECORD:	Referat: Chemie Zbl. 3, 168 (1904/05) kein Autor
ORO, J. u. D.A.RAPPOPORT:	J. biol. Chem. 234, 1661 (1959)
OSBORN, M.J., M.FREEMAN u. F.M.HUENNEKENS:	Proc. Soc. exp. Biol. 97, 429 (1958)
PERAULT, A.M. u. B.PULLMAN:	Biochem. Biophys. Acta 44, 251 (1960)
PETERS, J.M. u. D.M.GREENBERG:	Biochem. Biophys. Acta 32, 273 (1959)
PLAUT, G.W.E., J.BERTEIL u. H.A.LARDY:	J. biol. Chem. 184, 795 (1950)
POHL, J.:	Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 31, 281 (1893)
POTTS, A.M. u. L.JOHNSON:	Amer. J. Ophthal. 35, 107 (1952)
POTTS, A.M.:	Amer. J. Ophthal. 39, 86 (1955)
RABINOWITZ, J.C. u. H.TABOR:	J. biol. Chem. 233, 252 (1958)
RAPOPORT, S. u. M.MÜLLER:	Acta biochim. pol. 14, 143 (1967)
REIF, G.:	Dtsch. med. Wschr. 49, 183 (1923)

REINAUER, H., G. GRASSOW u. S. HOLLMANN: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 969 (1968)

REINAUER, H. u. S. HOLLMANN: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 40 (1969)

RIETBROCK, N.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 251, 189 (1965)

RIETBROCK, N.: Habilitationsschrift, Würzburg (1968 a)

RIETBROCK, N.: Arch. Toxikol. 24, 56 (1968 b)

RIETBROCK, N.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 263, 88 (1969)

RIETBROCK, N. u. W. D. HINRICHS: Klin. Wschr. 42, 981 (1964)

RIETBROCK, N., B. STIEREN u. G. MALORNY: Klin. Wschr. 44, 1318 (1966)

RIETBROCK, N., K. J. FREUNDT u. W. HERKEN: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 260, 191 (1968)

ROBINSON, F. A.: The Vitamin Co-Factors of Enzyme Systems, Pergamon Press, Oxford 1966

RÖE, O.: Acta med. scand. 113, 558 (1943)

RÖE, O.: Acta med. scand. 126, suppl. 182 (1946)

RÖE, O.: Acta Ophthal. (Kbh.) 26, 169 (1948)

RÖE, O.: Pharmacol. Rev. 7, 399 (1955)

ROSTEDT, R.: Rinska lädaresüllskapets handlingar 63, 113 (1921)
Zbl. Neu. 27, 51 (1922) (Ref.)

SAKAMI, W.: J. biol. Chem. 176, 995 (1948)

SAKAMI, W. u. A. D. WELCH: J. biol. Chem. 187, 379 (1950)

SCHARDINGER, F. Z.:	Z. Untersuch. Nahr.- u. Genußmitt. 5, 27 (1902)
SCHIMASSECK, H.:	Biochem. Z. 336, 460 (1963)
SCHMIEDEBERG, O.:	Therap. Monatshefte, Mai 1912
SCOTT, E., M. HELZ u. C. P. Mc CORD:	Amer. J. Clin. Path. 3, 311 (1933)
SIEGEL, J. u. J. LAFAYE:	Proc. Soc. exp. Biol. TN. Y) 74, 620 (1950)
SIEKEVITZ, P. u. D. M. GREENBERG:	J. biol. Chem. 186, 275 (1950)
SOLLMANN, T.:	J. Pharmacol. exp. Ther. 16, 291 (1921)
STINEBAUGH, B. J.:	Arch. intern. Med. 105, 613 (1960)
STRATEMANN, K.:	Dissertationsschrift Würzburg (1969)
STRITTMATTER, P. u. E. BALL:	J. biol. Chem. 213, 445 (1955)
STRÖHMBERG, O.:	Petersb. med. Z. 31, 55 (1904)
TERPHLY, T. R., R. E. PARKS u. G. J. MANNERING:	J. Pharmacol. exp. Ther. 131, 147 (1961)
TEPHLY, T. R., R. E. PARKS jr. u. G. J. MANNERING:	J. Pharmacol. exp. Ther. 143, 292 (1964)
THEILER	Z. Ref.: Jahresber. Pharmazie 58, 398 (1923)
USTVEDT, H. J. u. A. MOHN:	Norsk Mag. Laegevidensk. 93, 1191 (1932), zit. bei KOBRO
VERLY, W. G., J. M. KINNEY u. V. DU VIGNEAUD:	J. biol. Chem. 196, 19 (1952)
WERKHEISER, W. C.:	J. biol. Chem. 236, 888 (1961)

WIDMARK, E.M.P.:	Biochem. Z. 259, 285 (1933)
WIDMARK, E.M.P. u. N.BILDSTEIN:	Biochem. Z. 148, 325 (1924)
YANT, W.P. u. H.H.SCHRENCK:	J. industr. Hyg. 19, 337 (1937)
ZAKRZEWSKI, S.F.:	J. biol. Chem. 241, 2962 (1966)
ZAKRZEWSKI, S.F. u. A.SANSONE:	J. biol. Chem. 242, 5663 (1967)
ZAKRZEWSKI, S.F., M.T.HAKALA u. C.A.NICHOL:	Mol. Pharmacol. 2, 423 (1966)
ZATMAN, L.J.:	Biochem. J. 40, 67 (1946)

Lebenslauf

Am 4. 9. 1935 wurde ich als Sohn des Grundbesitzers Mohammed Bagher Naghdi und seiner Ehefrau Massumah im Iran geboren.

Im Jahre 1944 bin ich in der Stadt Jazd in die Schule gegangen und habe im Juni 1957 die Reifeprüfung bestanden.

Wegen familiärer Schwierigkeiten konnte ich nicht sofort mein Studium beginnen.
Erst im Juli 1962 kam ich nach Deutschland und begann ab Winter-Semester 1962/63 an der Universität Würzburg Medizin zu studieren. Im Oktober 1963 legte ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung ab. Im Sommersemester 1965 bestand ich die ärztliche Vorprüfung. Ebenfalls an der Universität Würzburg widmete ich mich ab Winter-Semester 1965/66 dem klinischen Teil des Studiums und bestand im Dezember 1968 die ärztliche Prüfung.

Von Januar 1969 bis April 1969 war ich als Medizinalassistent im Kreiskrankenhaus Miltenberg tätig und von April bis Oktober 1969 arbeitete ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur Bearbeitung erhalten habe.

Mohammad Naghdi